



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

# **La inducción de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN preserva la estabilidad genómica en células neuronales**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Química Biológica

Daniela Susana Castillo

Director de Tesis: Dr. Nicolás Pregi

Consejero de estudios: Dr. Eduardo Tomás Cánepa

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neuroepigenética

Departamento de Química Biológica

FCEyN - Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2015

## Agradecimientos

En primer lugar, a **Edu**. Por haberme dejado formar parte de tu laboratorio, por enseñarme tantas cosas, no sólo científicas, sino también de la vida cotidiana. Por tu paciencia y por tus “vos hacé lo que quieras, pero yo lo haría así...”. Por darme fuerzas en los últimos años. Sos un ejemplo de un trabajador, del esfuerzo, del ir para adelante. Si hay algo que rescato es la calidad humana que reina en tu laboratorio. Gracias por todos estos años! Te voy a extrañar! “La sapeti”.

A **Nico**. A pesar de nuestras diferencias, gracias por la ayuda y buena predisposición que me brindaste al principio de este camino.

A **Silvi**. Gracias por las infinitas charlas, por escucharme y entenderme. Por el aliento cuando lo necesitaba, por los consejos tan acertados. Por todas las risas y los cuentos compartidos.

A **Lau Bell**. No conozco a nadie que con tanta facilidad para zambullirse en sus pensamientos y abstraerse de su alrededor. Sos un ejemplo de lo capaz, de la crítica fundamentada y, principalmente, de la perseverancia. Gracias por toda tu ayuda y buena onda.

A **Brunito**. Porque si hubiera el premio al mejor compañero, sin duda sería tuyo. Sos una pieza clave en el laboratorio, siempre predispuesto a ayudar en cualquier tarea. Gracias por las charlas y por ser mi vecino “de lado” en estos años.

A **Marie Chertoff**. Desde el día que llegaste irradias una buena energía que contagias constantemente. Y ni hablar de tus ganas para todo. Fue muy lindo compartir mi último año de doctorado con vos.

A **Nadi**. Gracias por tu interés, por tu alegría. Sos super trabajadora y sé que tenés un excelente doctorado por transitar.

A **Octa**. Qué bueno que te integraste al laboratorio. Sos super pensador e inteligente, y no dejás de sorprenderme a la hora de las discusiones.

A **Caro**. No llegamos a compartir mucho, pero me encantó conocerte.

A los que pasaron por el laboratorio...

A **July**. Por tantas charlas y consejos que me diste. Por ser un gran aliento y empujón para seguirle dando adelante.

A **Lu**. Porque no sabés lo que te extrañé cuando te fuiste! Gracias por ser mi mentora muchas veces aunque ese no fuera tu papel y por la infinita ayuda hasta en la distancia.

A **Flopy**. Por todas esas charlas cada mañana. Por enseñarme y ayudarme tanto cuando empezaba. Ocupé tu mesada con mucho orgullo cuando te fuiste.

A **Marie Marazita**. Por tu risa y buen humor constante. Gracias por todo el interés que mostraste en el camino, tanto en aspectos laborales como personales.

A **Lau Byk**. Compartimos poquito, pero qué bueno fue conocerte. Tenés esas salidas que me hacen morir de risa.

A **Abel**. Te fuiste justo cuando entré al laboratorio. Gracias por la ayuda con el *paper*, sabé que lo valoro muchísimo.

A los integrantes de los **laboratorios vecinos y no tan vecinos del Departamento de Química Biológica**: los laboratorios de Juan Carlos Calvo y Cecilia Varone, Alejandra Guberman, Diego Laderach y Daniel Compagno, María del Carmen Ríos, Martín Monte, Mario Galignana, Mónica Kotler, Claudia Pérez Leirós, Silvia Moreno y Silvia Rossi, Elba Vázquez, Federico Coluccio, Adalí Pecci, Sandra Ruzal, Julia Pettinari, María del Carmen Vila y Verónica García. Gracias por toda la ayuda brindada, por compartir consejos y reactivos cuando fue necesario.

A **Pablo Radicella**. Gracias por recibirme en tu laboratorio y dejarme aprender y crecer tanto en tan poco tiempo. Por tu gran ayuda con el manuscrito del *paper*. A todos los integrantes de tu laboratorio por tan linda energía durante mi estadía. Principalmente a **Mariano**, por ser mi nexo argentino allá; a **Anna**, por tu excelente predisposición y contestar todas mis preguntas (que no eran pocas); y a **Fred**, por todo tu interés.

A mis **papás**, Susana y Marcelo. Por ser mis pilares, mi modelo a seguir. Por todo lo que me enseñaron y por alentarme a estudiar mi vocación. Por apoyar mis decisiones y darme tantas fuerzas durante la carrera y el doctorado.

A **Juan**. Por ser mi compañero, por transitar conmigo todo este camino. Gracias por tu ayuda, tus consejos y tu positividad. No hacen falta muchas palabras porque vos lo sabés.

*A mis papás*

*A Juan*



*"We totally missed the possible role of... [DNA] repair although...*

*I later came to realise that DNA is so precious that probably*

*many distinct repair mechanisms would exist."*

Francis Crick, Nature, 26 April 1974.

## **La inducción de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN preserva la estabilidad genómica en células neuronales**

Agentes genotóxicos endógenos y exógenos amenazan continuamente la integridad de la estructura molecular del ADN. Dentro del sistema nervioso, respuestas apropiadas al daño al ADN son requeridas para mantener la homeostasis celular y prevenir enfermedades. Dado que las neuronas maduras son células post-mitóticas altamente diferenciadas que no pueden ser reemplazadas –en su gran mayoría– en caso de trauma o enfermedad, las mismas han seleccionado mecanismos para defender la integridad de su genoma, por ende asegurando su longevidad y funcionalidad de cara a dichas amenazas. Defectos en la respuesta al daño al ADN en células neuronales están comúnmente asociados a neurodegeneración. La identificación de factores neuroprotectores y de supervivencia neuronal es clave para la comprensión de la progresión de desórdenes neurodegenerativos y para el establecimiento de terapias para menguar las consecuencias neurológicas de tales enfermedades.

La familia de factores de transcripción E2F fue originalmente involucrada en el desempeño de un rol crítico en el control del ciclo celular. Evidencias han dejado en claro que –dado a su plasticidad funcional– estos factores participan en la regulación de una plétora de procesos biológicos, que incluyen la respuesta celular al daño al ADN. El principal objetivo de este trabajo consistió en estudiar la participación de los miembros de la familia de factores de transcripción E2F en el mantenimiento de la integridad genómica en células neuronales, y evaluar su potencial papel como factores neuroprotectores.

En esta tesis se demostró que *E2F1* y *E2F2*, el último específicamente en células neuronales, son inducidos transcripcionalmente en respuesta al daño al ADN. Este mecanismo novedoso, el cual es común a la respuesta a diversos agentes genotóxicos y el cual se encuentra conservado en distintas especies, contribuye al incremento de los niveles proteicos de E2F1 y E2F2 como consecuencia de síntesis proteica *de novo*. Asimismo, se observó que E2F2 es estabilizado tempranamente por un mecanismo post-traducciona l luego de injuria genotóxica al igual que fue reportado previamente para E2F1. Por lo tanto, existen dos mecanismos consecutivos en el tiempo que conducen al aumento de E2F1 y E2F2 luego de daño al ADN: la estabilización proteica por modificaciones post-traduccionales de la proteína E2F ya sintetizada, seguida de la inducción transcripcional del gen *E2F* y la consecuente síntesis proteica *de novo*. De esta

manera, los factores E2F1 y E2F2 inducidos por daño al ADN contribuyen al mantenimiento de la integridad genómica y a la resistencia a la injuria genotóxica al promover la reparación del ADN, conllevando a una reducida respuesta apoptótica y a una incrementada supervivencia celular. Dichas respuestas las llevan a cabo al ejercer dos papeles diferentes. Primero, mediante un rol transcripcional que implica la expresión de genes que favorecen la supervivencia en respuesta al daño al ADN. Segundo, a través de un rol no-transcripcional, localizándose en sitios de lesión al ADN y promoviendo el reclutamiento de factores de reparación y proteínas remodeladoras de la cromatina.

En resumen, las evidencias presentadas en este trabajo establecen a E2F1 y E2F2 como factores neuroprotectores implicados en el mantenimiento de la estabilidad genómica en células neuronales en respuesta a injuria genotóxica. Es importante enfatizar que se demostró por primera vez que E2F2 es inducido por estrés genotóxico y que cumple un rol crítico en la respuesta al daño al ADN.

**Palabras clave:** células neuronales; estabilidad genómica; factor de transcripción E2F; reparación del ADN; respuesta al daño al ADN.

## **E2F1 and E2F2 induction in response to DNA damage preserves genomic stability in neuronal cells**

Endogenous and exogenous genotoxic agents continuously threaten the integrity of the molecular structure of DNA. Within the nervous system, appropriate responses to DNA damage are required to maintain cellular homeostasis and prevent disease. Since mature neurons are highly differentiated post-mitotic cells that cannot entirely be replaced after disease or trauma, they have evolved mechanisms to defend their genome integrity, hence ensuring their longevity and functionality in the face of these threats. Defects in the DNA damage response in neurons are commonly associated to neurodegeneration. The identification of neuroprotective and prosurvival factors is key to the understanding of neurodegenerative disorders progression and the establishment of therapies to ameliorate the neurological consequences of these diseases.

The E2F family of transcription factors was originally described to play a pivotal role in cell cycle control. It has become clear that –due to their functional plasticity– they participate in the regulation of a plethora of biological processes, including the cellular response to DNA damage. The main aim of the present study consisted in studying the participation of the members of the E2F family of transcription factors in the maintenance of genomic integrity in neuronal cells, and to evaluate their potential role as neuroprotective factors.

In this thesis it was shown that *E2F1* and *E2F2*, the latter specifically in neuronal cells, are transcriptionally induced in response to DNA damage. This novel mechanism, which is general to the response to different genotoxic agents and is conserved amongst diverse species, leads to increased E2F1 and E2F2 protein levels as a consequence of *de novo* protein synthesis. Besides, it was demonstrated that E2F2 is early stabilized by a posttranslational mechanism upon genotoxic injury as it was previously reported for E2F1. Therefore, there are two consecutive mechanisms that lead to the upregulation of E2F1 and E2F2 following DNA damage: the posttranslational modifications of the already synthesized E2F and consequent protein stabilization, followed by *E2F* transcriptional gene induction and *de novo* protein synthesis. The resulting E2F1 and E2F2 act to promote DNA repair, leading to a reduced apoptotic response and an increased cell survival capability, thereby conferring resistance to genotoxic insult and cooperating in the maintenance of the

genome integrity. These responses are performed by E2F1 and E2F2 through two different roles. First, a transcriptional function involving the expression of prosurvival genes in response to DNA damage. Second, a nontranscriptional role in which these E2Fs localize to sites of DNA lesion upon genotoxic stress, and promote the recruitment of DNA repair factors and chromatin modifying enzymes.

In summary, the evidence presented in this work establishes E2F1 and E2F2 as neuroprotective factors implicated in the maintenance of genomic stability in neuronal cells in response to genotoxic injury. It should be emphasized that it was shown for the first time that E2F2 is upregulated following genotoxic stress and plays a critical role in the DNA damage response.

**Keywords:** neuronal cells; genomic stability; E2F transcription factor; DNA repair; DNA damage response.

## Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
1. Mantenimiento de la integridad del genoma .....	3
1.1. Participantes en la respuesta al daño al ADN .....	4
1.1.1. Sensores .....	4
1.1.2. Mediadores .....	4
1.1.3. Efectores .....	5
2. Familia de factores de transcripción E2F .....	5
2.1. Miembros de la familia E2F .....	5
2.2. Plasticidad funcional de E2F .....	7
2.2.1. E2F y el ciclo celular .....	7
2.2.2. Participación de E2F en la respuesta al daño al ADN .....	10
2.2.3. E2F y apoptosis .....	12
3. Agentes genotóxicos .....	14
3.1. Neocarzinostatina .....	14
3.2. Peróxido de hidrógeno .....	15
3.3. Radiación UV .....	15
4. Sistemas de reparación del ADN dañado .....	15
5. Daño al ADN y enfermedades neurodegenerativas .....	17
<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	21
Hipótesis .....	22
Objetivos .....	23
<b>Resultados</b> .....	24
1. E2F1 y E2F2 son inducidos transcripcionalmente en respuesta al daño al ADN en células neuronales .....	25
2. E2F1 y E2F2 son sintetizados <i>de novo</i> luego del tratamiento genotóxico en células neuronales .....	29
3. La inducción transcripcional de E2F1 y E2F2 en respuesta a estrés genotóxico requiere de la actividad de las quinasas ATM/ATR y MEK .....	33
4. E2F1 y E2F2 inducidos por daño al ADN son activos en sus funciones reguladoras de la transcripción .....	34

5. La inducción de E2F1 y E2F2 por estrés genotóxico no afecta el ciclo celular .....	37
6. La inducción de E2F1 y E2F2 previene la acumulación de daño al ADN en respuesta a estrés genotóxico .....	39
7. La inducción de E2F1 y E2F2 reduce la respuesta apoptótica como consecuencia del daño al ADN .....	44
8. E2F1 y E2F2 inducidos por daño al ADN confieren una incrementada resistencia celular a agentes genotóxicos .....	46
9. E2F1 y E2F2 se acumulan en sitios de lesión al ADN .....	47
10. E2F2 promueve la formación de <i>foci</i> de Rad51 e induce la acetilación de histonas en respuesta al daño al ADN .....	51
11. E2F1 y E2F2 se asocian a los promotores de <i>TP53</i> y <i>BRCA1</i> e inducen su transcripción luego de irradiación UV .....	53
<b>Conclusiones</b> .....	57
<b>Discusión</b> .....	59
E2F1 y E2F2: factores de supervivencia neuronal	
1. Inducción: dos contribuciones consecutivas en el tiempo .....	61
2. Mecanismo de acción.....	63
3. En supervivencia neuronal .....	67
4. Modelo propuesto .....	70
5. Esencia .....	71
<b>Materiales y Métodos</b> .....	73
1. Cultivo de líneas celulares .....	74
1.1. Condiciones de crecimiento .....	74
1.2. Mantenimiento .....	74
1.3. Determinación del número de células y su viabilidad .....	74
2. Cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata .....	75
2.1. Preparación de las placas de cultivo .....	75
2.2. Preparación de los cultivos primarios .....	75
3. Agentes genotóxicos .....	76
3.1. Neocarzinostatina.....	76
3.2. Peróxido de hidrógeno .....	76
3.3. Irradiación ultravioleta.....	76
4. Agentes inhibidores de procesos de síntesis celular .....	77

5. Agentes inhibidores de cascadas de transducción de señales .....	77
6. Obtención y preparación de plásmidos .....	78
6.1. Plásmidos.....	78
6.2. Obtención de bacterias competentes .....	80
6.3. Transformación de bacterias competentes .....	80
6.4. Preparación de plásmidos en baja escala (miniprep) .....	80
6.5. Preparación de plásmidos en gran escala (maxiprep).....	81
6.6. Análisis de las preparaciones plasmídicas .....	81
7. Subclonado del ADNc de E2F2 en el vector pEGFP-C1 .....	81
8. Disminución de los niveles de E2F1 y E2F2 .....	82
9. Disminución de la disponibilidad de los factores E2F.....	82
10. Transfección transitoria de líneas celulares .....	83
11. Análisis de ARN por Northern Blot.....	83
11.1. Aislamiento del ARN total .....	83
11.2. Electroforesis del ARN.....	83
11.3. Transferencia del ARN a la membrana.....	84
11.4. Marcación de sondas.....	84
11.5. Hibridización .....	85
11.6. Autorradiografía y cuantificación.....	85
11.7. Stripping.....	85
12. Análisis de ARN por RT-qPCR.....	86
12.1. Aislamiento del ARN total .....	86
12.2. Obtención del ADNc mediante transcripción reversa o retrotranscripción.....	86
12.3. PCR en tiempo real o cuantitativa.....	87
13. Análisis de proteínas por Western Blot.....	88
13.1. Preparación del lisado celular total .....	88
13.2. Método de ácido bicinonínico .....	89
13.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes .....	89
13.4. Transferencia a la membrana.....	90
13.5. Detección de proteínas .....	90
14. Co-inmunoprecipitación.....	91
15. Fraccionamiento subcelular y extracción de la cromatina.....	92
16. Fraccionamiento subcelular con Tritón X-100 .....	93
17. Inmunoprecipitación de la cromatina.....	93



17.1. <i>Cross-linking</i> .....	93
17.2. <i>Chequeo de la sonicación de la cromatina</i> .....	94
17.3. <i>Inmunoprecipitación</i> .....	95
17.4. <i>Reversión del cross-linking y extracción del ADN</i> .....	95
17.5. <i>Amplificación del ADN obtenido por ChIP</i> .....	96
18. <i>Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo</i> .....	97
19. <i>Determinación de la actividad transactivadora del factor E2F</i> .....	97
19.1. <i>Transfección de células en cultivo</i> .....	97
19.2. <i>Preparación de extractos celulares</i> .....	98
19.3. <i>Determinación de la actividad cloranfenicol acetiltransferasa</i> .....	98
19.4. <i>Determinación de la actividad <math>\beta</math>-galactosidasa</i> .....	99
20. <i>Inmunofluorescencia</i> .....	99
21. <i>Ensayo de reparación del ADN - Slot Blot</i> .....	100
22. <i>Ensayo de actividad de la enzima caspasa-3</i> .....	101
23. <i>Ensayo de MTT</i> .....	101
24. <i>Ensayo clonogénico</i> .....	102
25. <i>Inmunoprecipitación de la cromatina y Slot Blot</i> .....	102
25.1. <i>Cross-linking</i> .....	102
25.2. <i>Chequeo de la sonicación de la cromatina</i> .....	103
25.3. <i>Inmunoprecipitación</i> .....	103
25.4. <i>Reversión del cross-linking y extracción del ADN</i> .....	104
26. <i>Microirradiación y live-cell imaging</i> .....	104
27. <i>Análisis estadístico de datos</i> .....	105
<b>Referencias</b> .....	106
<b>Apéndice</b> .....	124

## **Abreviaturas**

**ASCAT:** oligodeoxinucleótido antisentido de cloranfenicol acetiltransferasa

**ASE2F1:** oligodeoxinucleótido antisentido de E2F1

**ASE2F2:** oligodeoxinucleótido antisentido de E2F2

**ASLUC:** oligodeoxinucleótido antisentido de luciferasa

**BER:** reparación por escisión de bases

**CAT:** cloranfenicol acetiltransferasa

**CPD:** dímeros de pirimidina ciclobutano

**DDR:** respuesta al daño al ADN

**DOE2Fmut:** oligodeoxinucleótido *decoy* mutado de E2F

**DOE2Fwt:** oligodeoxinucleótido *decoy wild type* de E2F

**DSB:** rotura doble cadena

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno

**HR:** reparación por recombinación homóloga

**MMR:** reparación de errores de apareamiento

**MTT:** bromuro de 3-[4,5 dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio

**NCS:** neocarzinostatina

**NER:** reparación por escisión de nucleótidos

**NHEJ:** reparación por unión de extremos no homólogos

**ODN:** oligodeoxinucleótido

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**SSB:** rotura simple cadena

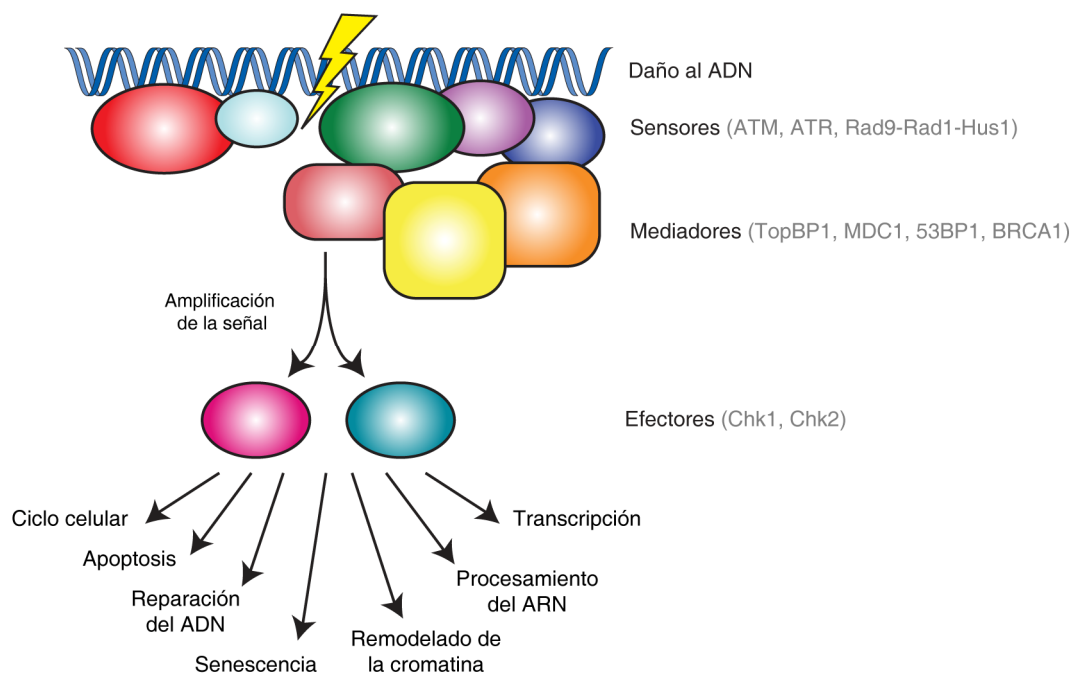
**UV:** radiación ultravioleta

# Introducción



## 1. Mantenimiento de la integridad del genoma

El objetivo primordial de toda forma de vida es la transmisión de su material genético de manera intacta a la siguiente generación. Este proceso debe ser llevado a cabo a pesar del efecto nocivo sobre el ADN de agentes genotóxicos endógenos (intracelulares) y exógenos (ambientales). En humanos, las  $\sim 10^{13}$  células que lo componen reciben más de  $10^4$  lesiones al ADN cada día (Lindahl and Barnes 2000). Dichas lesiones pueden bloquear la replicación del ADN o su transcripción, y si su reparación es incorrecta o nula, pueden conducir a mutaciones o aberraciones genómicas a gran escala que ponen en riesgo la viabilidad celular o del organismo y predisponen al desarrollo de tumores, inmunodeficiencias y desórdenes neurológicos. De esta manera, para asegurar la supervivencia y la propagación del genoma a lo largo de las generaciones, las células eucariotas poseen diversos mecanismos que, en conjunto, constituyen la respuesta al daño al ADN o DDR (*DNA damage response*) (Figura I).



**Figura I. Modelo de respuesta al daño al ADN o DDR.** La presencia de lesiones en el ADN activa la vía DDR, la cual está compuesta por sensores, mediadores y efectores, los cuales gatillan diversas cascadas de señalización que activan una plétora de procesos celulares. Modificado de Jackson y Bartek, 2009.

La vía DDR está compuesta por moléculas sensoras, mediadoras y efectoras, las cuales están encargadas de detectar lesiones en el ADN y gatillar múltiples cascadas de señalización que tienen impacto sobre un amplio rango de procesos celulares. Luego

de un estrés genotóxico, la vía DDR gatilla una respuesta integradora que implica la activación de los puntos de control del ciclo celular, la reparación del ADN, el remodelado de la cromatina, y la activación de la transcripción y el procesamiento del ARN. En caso que el daño no pueda ser reparado, señala hacia la muerte celular por apoptosis o hacia la senescencia celular (Zhou and Elledge 2000; Jackson and Bartek 2009).

### **1.1. Participantes en la respuesta al daño al ADN**

La respuesta al daño al ADN es una vía jerárquica compuesta por una serie de pasos. En primer lugar, las lesiones al ADN son detectadas por proteínas sensoras, las cuales reconocen las lesiones propiamente dichas o bien las alteraciones producidas en la estructura de la cromatina. A continuación, las proteínas mediadoras entran en acción, encargadas de amplificar la señal de daño y transmitirla a las proteínas efectoras. Estas últimas se encuentran río abajo en la cascada de señalización y modulan numerosas respuestas interconectadas que actúan en el mantenimiento de la homeostasis celular frente al daño al ADN (Zhou and Elledge 2000; Su 2006).

#### **1.1.1. Sensores**

En mamíferos, los componentes clave en la señalización de la vía DDR son las quinasas ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) y ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related*), las cuales actúan como sensores de daño al ADN. ATM y ATR son reclutadas y activadas por roturas doble cadena (DSBs o *double-strand breaks*) y ADN simple cadena recubierto por RPA (*replication protein A*) respectivamente (Zou and Elledge 2003; Lee and Paull 2005). Por otro lado, el complejo ADN simple cadena-RPA promueve también el reclutamiento de Rad9-Rad1-Hus 1 (9-1-1), el cual está encargado de atraer al sitio de daño a proteínas mediadoras específicas que serán sustrato de las quinasas ATM y ATR (Yang and Zou 2006).

#### **1.1.2. Mediadores**

Las proteínas mediadoras son reclutadas a los sitios de lesión por modificaciones en las colas de las histonas o bien por otros factores de los puntos de control del ciclo celular (Lazaro, Giannattasio et al. 2009). Las mismas son responsables de amplificar la cascada de señalización al proveer una plataforma para el reclutamiento de proteínas efectoras en un sitio cercano a las proteínas apicales sensoras, y así favorecer su

activación por estas últimas. Una de las proteínas mediadoras es TopBP1, la cual es reclutada por 9-1-1 a sitios de lesión ADN simple cadena, donde estimula la actividad de ATR y, a su vez, es sustrato de ATM y ATR (Kumagai, Lee et al. 2006). Por otro lado, la histona H2AX es fosforilada en Ser139 por ATM y ATR en los sitios de lesión, siendo dicha marca la señal para el reclutamiento a los *foci* de daño de diversas proteínas mediadoras, tales como MDC1, 53BP1 y BRCA1 (Rogakou, Pilch et al. 1998; Stucki and Jackson 2006; Mailand, Bekker-Jensen et al. 2007).

### 1.1.3. Efectores

Las proteínas efectoras forman parte de un amplio y diverso grupo compuesto por reguladores del ciclo celular, proteínas de la maquinaria de reparación del ADN, proteínas remodeladoras de la cromatina y factores de la maquinaria de transcripción y procesamiento del ARN. Entre ellas, se incluyen a las quinasas Chk1 (*checkpoint kinase 1*) y Chk2 (*checkpoint kinase 2*), sustratos de ATM y ATR. Dichas quinasas contribuyen a la activación de los puntos de control del ciclo celular en las fases G1/S, S o G2/M. El arresto del ciclo celular estimula la reparación y otorga tiempo para que el daño al ADN pueda ser removido. En caso de que esto no ocurra, se gatilla la muerte celular por apoptosis o bien la senescencia celular. Por otro lado, Chk1 y Chk2 fosforilan diversas proteínas involucradas en los procesos mencionados anteriormente (Harper and Elledge 2007). Una de ellas es el factor de transcripción E2F1, el cual es blanco de fosforilación no solo de Chk2, sino también de ATM y ATR (Lin, Lin et al. 2001; Stevens, Smith et al. 2003).

## 2. Familia de factores de transcripción E2F

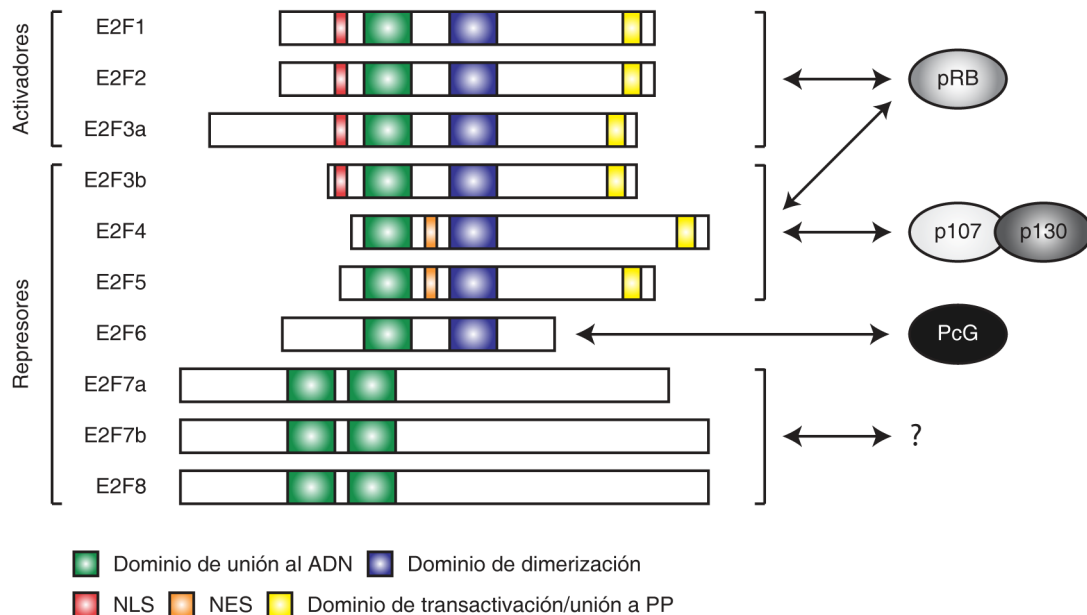
### 2.1. Miembros de la familia E2F

E2F fue originalmente descubierto como un factor capaz de unirse al promotor del gen adenoviral E2 y activar su transcripción (Kovesdi, Reichel et al. 1986). De dicha actividad proviene el nombre E2F o *E2 promoter binding factor*. E2F ha sido descrito en mamíferos, nematodos, ranas, moscas y plantas (Reichel, Kovesdi et al. 1987; Dynlacht, Brook et al. 1994; Ramirez-Parra, Xie et al. 1999; Suzuki and Hemmati-Brivanlou 2000; Page, Guedes et al. 2001).

En mamíferos, la familia de factores de transcripción E2F está codificada por ocho genes, *E2F1* a *E2F8*, los cuales dan lugar a diez proteínas diferentes. Estas incluyen a

E2F3a y E2F3b, las cuales son generadas por el uso de promotores alternativos (He, Armanious et al. 2000; Leone, Nuckolls et al. 2000); y a dos productos de *splicing* alternativo, E2F7a y E2F7b (Di Stefano, Jensen et al. 2003).

En relación a su estructura (*Figura II*), todos los miembros de la familia poseen un dominio conservado de unión al ADN. En particular, E2F1 a E2F5 contienen un dominio de transactivación y unión a proteínas de Retinoblastoma o *pocket*. E2F1 a E2F6 tienen además un dominio de dimerización requerido para la interacción con un componente de la familia DP (*differentiation-regulated transcription factor protein*) -DP1, DP2/3 o DP4-. Dicha dimerización es un requisito necesario para la unión específica y de alta afinidad de los factores E2F a los elementos en *cis* de sus genes blanco. E2F1, E2F2, E2F3a y E2F3b poseen una señal de localización nuclear, mientras que E2F4 y E2F5 contienen una señal de exportación nuclear. E2F7 y E2F8 carecen del dominio de dimerización y por ello son conocidos como factores E2F “atípicos”. De todas maneras, dado que presentan el dominio de unión al ADN duplicado, se unen al ADN independientemente de DP formando homodímeros E2F7-E2F7 o E2F8-E2F8, o bien heterodímeros E2F7-E2F8 (Iaquinta and Lees 2007; Lammens, Li et al. 2009).



**Figura II. Familia de factores de transcripción E2F.** Estructura y clasificación en “activadores” y “represores” de los factores E2F. NLS, señal de localización nuclear; NES, señal de exportación nuclear; PP, proteína *pocket*. Modificado de Iaquinta y Lees, 2007.

Tradicionalmente, los miembros de la familia E2F son clasificados en dos grupos de acuerdo a su actividad transcripcional, estructura e interacción con los componentes de

de la familia de proteínas *pocket* –pRB, p107 y p130– (*Figura II*). Por un lado, E2F1, E2F2 y E2F3a –que interactúan solamente con pRB– constituyen los “activadores” debido a que promueven la expresión de sus genes blanco. Los mismos son expresados en un patrón dependiente del ciclo celular, con niveles máximos en las fases G1 tardía y S temprana. Por otro lado, E2F3b, E2F4 y E2F5 –capaces de unir a todas las proteínas *pocket*– son considerados “represores” por su capacidad de limitar la transcripción del mismo *set* de genes blanco. Estos son expresados constitutivamente en el transcurso del ciclo celular (Jaquinta and Lees 2007). Los miembros restantes también ejercen una función represora pero independientemente de las proteínas *pocket* (Cartwright, Muller et al. 1998; Di Stefano, Jensen et al. 2003; Christensen, Cloos et al. 2005). E2F6 reprime la transcripción de sus genes blanco al asociarse con proteínas represoras PcG (*polycomb group*) (Trimarchi, Fairchild et al. 2001). El mecanismo de represión por E2F7 y E2F8 es aún desconocido, pero se propone que reclutan complejos represores modificadores de la cromatina o bien compiten con los E2F “activadores” por un mismo sitio de unión de E2F al ADN (Lammens, Li et al. 2009).

## 2.2. Plasticidad funcional de E2F

Además de su conocido rol dentro del ciclo celular, los factores E2F participan en la regulación de un amplio rango de procesos biológicos, tales como desarrollo, diferenciación, apoptosis, autofagia y respuesta al daño al ADN (Dimova and Dyson 2005; DeGregori and Johnson 2006; Polager and Ginsberg 2008).

La red regulatoria de los factores E2F presenta una gran plasticidad funcional según el contexto. Por un lado, existe una especificidad de función de cada miembro de la familia, acompañada de su habilidad de respuesta a diversas señales célula- o tejido-específicas. Por otro lado, la especificidad de cada miembro E2F por un sitio de unión está dictado, no solo por la secuencia del ADN, sino también por las interacciones con otros factores de transcripción unidos a elementos regulatorios vecinos (DeGregori 2005; DeGregori and Johnson 2006).

### 2.2.1. E2F y el ciclo celular

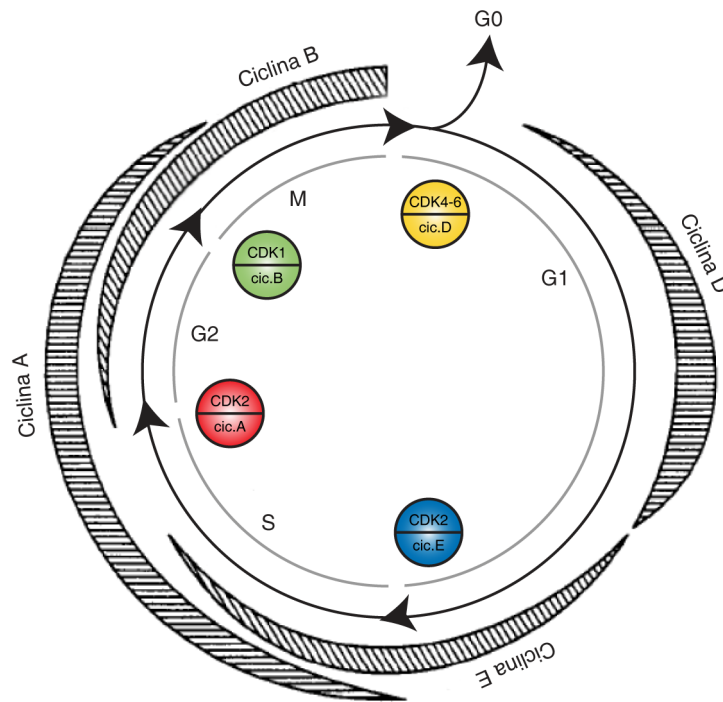
El ciclo celular es un proceso que implica la participación de diversas proteínas regulatorias en etapas sucesivas, cuyo fin último es la generación de dos células hijas idénticas en su material genético. El mismo está compuesto por cuatro fases: G1, S, G2



y M. Las fases G1 y G2 constituyen períodos *gap* durante los cuales las células se preparan para los eventos claves de duplicación del ADN (fase S) y mitosis (fase M) respectivamente (Norbury and Nurse 1992). En ausencia de factores de crecimiento, las células abandonan el ciclo celular e ingresan en la fase G0. Dicha fase consiste en un estado de quiescencia en el cual las células detienen la división celular pero mantienen su metabolismo activo. El ingreso a G0 se realiza a partir de un punto de control de la fase G1 conocido como punto de restricción o punto R. En el mismo, las células evalúan la presencia de los estímulos mitogénicos necesarios para la progresión del ciclo celular. El punto R determina una situación de no-retorno ya que la ausencia de mitógenos previo a tal punto temporal implica la entrada a fase G0, mientras que alcanzado el punto R la carencia de nutrientes no afecta la progresión del ciclo celular debido a que las células ya se encuentran comprometidas independientemente de los factores externos (Pardee 1974; Pardee 1989).

La progresión del ciclo celular está estrictamente regulada por tres factores principales: las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las ciclinas y las proteínas inhibitorias de la actividad CDK (CKIs). Las CDKs son quinasas Ser/Thr que al formar complejos activos heterodiméricos con las ciclinas, fosforilan diversos sustratos permitiendo el avance de las células a través de las fases del ciclo celular. Las ciclinas, como su nombre lo indica, poseen una expresión cíclica a lo largo del ciclo celular. Por lo general, previo al ingreso en una nueva fase del ciclo, la ciclina de la fase anterior debe haber sido degradada, y aquella correspondiente a la nueva fase debe haber sido sintetizada. A diferencia de las CDKs, las ciclinas poseen una señal de localización nuclear, y al unir y activar a su CDK específica, la dirigen al núcleo para que ejerza su función. Los complejos CDK-ciclina involucradas en cada fase son: CDK4-ciclina D o CDK6-ciclina D en la fase G1 temprana, CDK2-ciclina E o CDK2-ciclina A para completar la fase G1 e iniciar la fase S, y CDK1-ciclina A o CDK1-ciclina B en la fase M (Pines 1991; van den Heuvel and Harlow 1993; Pines 1995). Por otro lado, además de la necesidad de unión a su ciclina correspondiente, la actividad de las CDKs se encuentra regulada por las CKIs. Estas constituyen dos familias: la familia INK4 –compuesta por p14INK4a, p15INK4b, p18INK4c y p19INK4d– y la familia Cip/Kip –integrada por p21, p27 y p57–. Los miembros de la familia INK4 unen a CDK4/6 e inhiben su unión a ciclina D, mientras que los miembros de la familia Cip/Kip poseen el potencial de inhibir a diversas CDKs, pero principalmente impiden la formación de los complejos

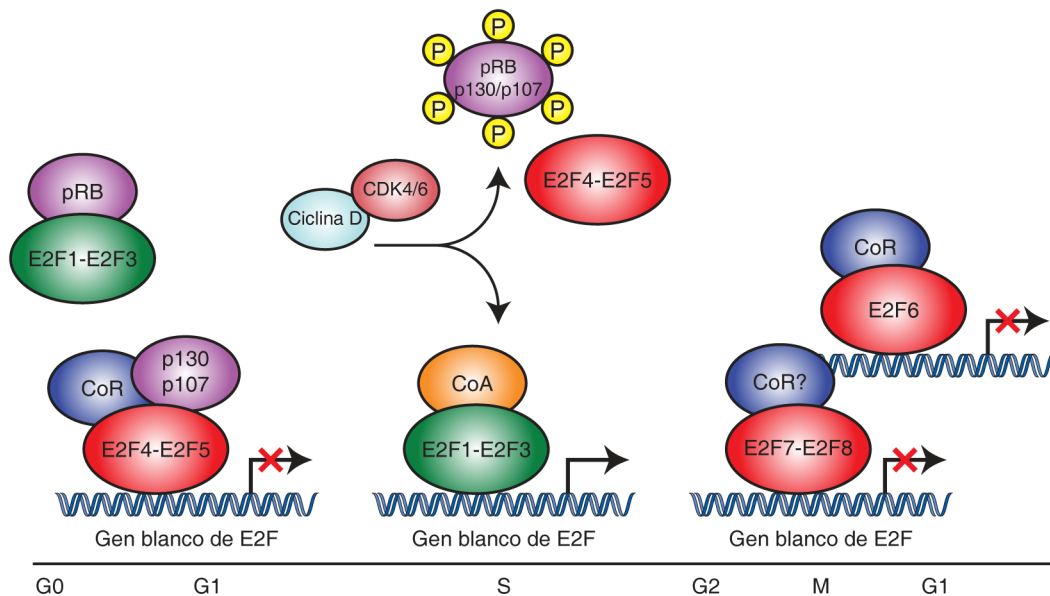
CDK2-ciclina E/A y CDK1-ciclina B (Hirama and Koeffler 1995; Sherr and Roberts 1999; Ortega, Malumbres et al. 2002). De esta manera, esta red regulatoria establecida por la actividad de los factores CDKs, ciclinas y CKIs permite la orquestada progresión del ciclo celular (Schafer 1998) (*Figura III*).



**Figura III. Regulación del ciclo celular.** Progresión del ciclo celular en las fases G1, S, G2 y M. Se muestran los principales complejos CDK-ciclina involucrados en cada fase y los niveles de las ciclinas. Modificado de Schafer 1998.

Los miembros de la familia E2F cumplen un rol clave en la regulación del ciclo celular (*Figura IV*). En G0/G1, las proteínas *pocket* se encuentran hipofosforiladas. En dicho estado, unen a los factores E2F “activadores” formando complejos inactivos para transactivar debido a que la interacción enmascara el dominio de transactivación de E2F. Por otro lado, las proteínas *pocket* se asocian a los E2F “represores” E2F4 y E2F5 junto con enzimas co-represoras –tales como deacetilasas o metiltransferasas de histonas (HDACs o HMTs) y complejos remodeladores de la cromatina ATP-dependientes–, dando lugar a complejos capaces de reprimir la transcripción génica. Tras un estímulo mitogénico, las proteínas *pocket* son hiperfosforiladas por los complejos CDK4/6-ciclina D, suceso que acarrea la liberación de los factores E2F. En consecuencia, los E2F “activadores” junto con enzimas co-activadoras –tales como acetiltransferasas de histonas (HATs)–, promueven la expresión de sus genes blanco; mientras que los E2F “represores” E2F4 y E2F5 son exportados activamente hacia el

citoplasma (Stevaux and Dyson 2002; Trimarchi and Lees 2002; Frolov and Dyson 2004; Cobrinik 2005). Este transcriptoma específico de G1/S es finalmente atenuado en las fases S tardía y G2 por los factores E2F “represores” E2F6 a E2F8, los cuales reprimen de forma independiente a las proteínas *pocket* (Trimarchi, Fairchild et al. 2001; Chen, Tsai et al. 2009; Lammens, Li et al. 2009).



**Figura IV. Regulación del ciclo celular por la familia de factores de transcripción E2F.** Participación de los E2F “activadores” y “represores” en la regulación del ciclo celular. CoR, co-represor; CoA, co-activador. Modificado de Chen, Tsai et al. 2009.

### 2.2.2. Participación de E2F en la respuesta al daño al ADN

E2F1 fue el primer miembro de la familia en ser relacionado con la respuesta celular al daño al ADN: el tratamiento con diversos agentes genotóxicos conduce al aumento de los niveles proteicos de E2F1 (Huang, Ishiko et al. 1997; Blattner, Sparks et al. 1999; O'Connor and Lu 2000; Lin, Lin et al. 2001). Trabajos posteriores demostraron que los niveles proteicos de E2F4 disminuyen, mientras que los de E2F3a, E2F7 y E2F8 aumentan luego de injuria genotóxica (Ma, Freeman et al. 2004; Zalmas, Zhao et al. 2008; Martinez, Goluszko et al. 2010).

El componente de la familia mejor estudiado en relación a su regulación y función luego de estrés genotóxico es E2F1. Su participación en la respuesta al daño al ADN puede ser descripta desde tres ángulos diferentes: (i) las modificaciones post-traduccionales que sufre como consecuencia del daño al ADN, (ii) su actividad

reguladora de la transcripción en asociación con proteínas específicas, y, por último, (iii) su reclutamiento a sitios de lesión al ADN (Biswas and Johnson 2012).

### **(i) Modificaciones post-traduccionales de E2F1 en respuesta al daño al ADN**

Luego de una injuria genotóxica, E2F1 es fosforilado en Ser31 por las quinasas ATM y ATR, y en Ser364 por Chk2 (Lin, Lin et al. 2001; Stevens, Smith et al. 2003). La fosforilación en Ser31 previene la interacción entre E2F1 y el complejo ubiquitín-ligasa p45Skp2. De esta manera, E2F1 se asocia al complejo 14-3-3 $\tau$  por su dominio N-terminal y evita ser ubiquitinado y degradado por el proteasoma (Wang, Liu et al. 2004). Dicha estabilización se condice con los niveles proteicos elevados de E2F1 observados en respuesta al daño al ADN (Huang, Ishiko et al. 1997; Blattner, Sparks et al. 1999; O'Connor and Lu 2000; Lin, Lin et al. 2001). Asimismo, si bien se desconoce el mecanismo, se considera que la fosforilación por Chk2 también contribuye a la estabilización de E2F1.

Por otro lado, E2F1 es acetilado tras estrés genotóxico en Lys117, 120 y 125 por las acetiltransferasas p300/CBP (*p300/CREB-binding protein*) y P/CAF (*p300/CREB-binding protein-associated factor*). Tales modificaciones conllevan a una incrementada estabilización y actividad transactivadora de E2F1 (Ianari, Gallo et al. 2004; Galbiati, Mendoza-Maldonado et al. 2005).

Trabajos recientes han demostrado que E2F1 sufre modificaciones post-traduccionales adicionales en respuesta al daño al ADN. Estas incluyen la fosforilación en Ser403 por una quinasa aún desconocida, la deacetilación por SIRT1 (*NAD-dependent deacetylase sirtuin-1*) y la demetilación de Lys185 llevada a cabo por la demetilasa LSD1 (*lysine-specific demethylase 1*) (Wang, Chen et al. 2006; Pediconi, Guerrieri et al. 2009; Kontaki and Talianidis 2010; Real, Espada et al. 2010).

### **(ii) Actividad transactivadora de E2F1 luego de injuria genotóxica**

La actividad transactivadora de E2F1 en respuesta al daño al ADN se encuentra regulada por su interacción con proteínas específicas. Se sabe que los complejos E2F1-pRB son potentes reclutadores de enzimas capaces de acetilar, metilar o remodelar la cromatina (Frolov and Dyson 2004). Por un lado, dichos complejos se convierten en represivos al asociarse con las proteínas remodeladoras de nucleosomas BRG1/hBRM, las metiltransferasas SUV39H1 o PRMT5, o HDACs (Strober, Dunaief et

al. 1996; Ferreira, Magnaghi-Jaulin et al. 1998; Luo, Postigo et al. 1998; Vandel, Nicolas et al. 2001; Fabbrizio, El Messaoudi et al. 2002). Por otro lado, los complejos E2F1-pRB se tornan activadores al interactuar con HATs, tales como p300/CBP, P/CAF o Tip60 (Martinez-Balbas, Bauer et al. 2000; Morris, Allen et al. 2000; Taubert, Gorrini et al. 2004). Además, E2F1 es capaz de asociarse –independientemente de pRB– a las proteínas MCPH1 o TopBP1, promoviendo la activación o represión transcripcional de genes blanco respectivamente (Liu, Lin et al. 2003; Liu, Luo et al. 2004; Yang, Lin et al. 2008).

### **(iii) Reclutamiento de E2F1 a sitios de lesión al ADN**

Trabajos recientes sugieren un rol de E2F1 en la reparación del ADN. E2F1 es reclutado por TopBP1 a sitios de lesión inducidos por irradiación UV y también a regiones del ADN con DSBs. Allí, E2F1 promueve a su vez el reclutamiento de factores de reparación y de enzimas modificadoras de la cromatina. E2F1 es requerido para reclutar eficientemente los factores de reparación p62, XPA y XPC a sitios de daño por irradiación UV, y, por otro lado, los factores de reparación Nbs1, RPA y Rad51 a sitios de DSBs. Además, E2F1 ha sido implicado en un mecanismo epigenético que favorece la acetilación de la histona H3 en Lys9, al reclutar a la acetiltransferasa GCN5 a sitios de lesión. De esta manera, E2F1 contribuye al mantenimiento de una conformación más laxa de la cromatina, aumentando la accesibilidad de factores de reparación a los sitios de lesión (Guo, Chen et al. 2010; Chen, Zhu et al. 2011; Guo, Chen et al. 2011).

### **2.2.3. E2F y apoptosis**

Reforzando el concepto de plasticidad funcional, los miembros de la familia E2F pueden promover o antagonizar la muerte celular por apoptosis dependiendo del tipo celular, estadio de desarrollo y la señal promotora de apoptosis (DeGregori and Johnson 2006).

Estudios en células de mamífero describen que la sobreexpresión de E2F, o su activación en respuesta al daño al ADN, conducen a la muerte celular por apoptosis (Asano, Nevins et al. 1996). Algunos trabajos han demostrado que la inducción de apoptosis es una propiedad única de E2F1, mientras que otros han reportado que E2F2 y E2F3 también poseen dicha capacidad (Kowalik, DeGregori et al. 1998; Vigo, Muller et al. 1999; Ziebold, Reza et al. 2001; Pediconi, Ianari et al. 2003). Una pregunta que

surge a partir de los estudios mencionados es: ¿por qué la elevada actividad de E2F que ocurre normalmente durante la fase S no conlleva a la muerte celular durante la progresión del ciclo celular? Por un lado, se sabe que la vía de señalización PI3K-Akt inhibe indirectamente la inducción de apoptosis por E2F1 al fosforilar a TopBP1, proteína que une a E2F1 y lo secuestra en *foci* nucleares de BRCA1, inhibiendo así su actividad transcripcional. Esta interacción con TopBP1 ocurre no solo en la transición de las fases G1/S, sino también en respuesta al daño al ADN. Además, vale destacar que se ha determinado que E2F1 activa a Akt en células humanas, sugiriendo un *feedback* entre Akt y E2F1 por medio del cual E2F1 podría regular su propia actividad apoptótica (Liu, Lin et al. 2003; Liu, Luo et al. 2004; Chaussepied and Ginsberg 2005; Liu, Paik et al. 2006). Por otro lado, se ha reportado que el factor de transcripción GABP1g también une a E2F1 y, en consecuencia, inhibe específicamente su capacidad de activar la transcripción de genes pro-apoptóticos sin afectar su capacidad transactivacional (Hauck, Kaba et al. 2002).

En respuesta al daño al ADN, E2F1 presenta un rol dicotómico ya que puede conducir a apoptosis o bien a supervivencia celular. La inducción de muerte celular programada por E2F1 puede ser de forma dependiente de p53 –al activar al gen p19ARF, el cual indirectamente incrementa los niveles de p53 al inhibir su degradación–, o independientemente de p53 –mediante la activación transcripcional de genes pro-apoptóticos tales como p73, Bcl2, Apaf1, caspasa-3 y caspasa-9– (Bates, Phillips et al. 1998; Muller, Bracken et al. 2001; Bracken, Ciro et al. 2004). Vale señalar que si bien en la vía independiente de p53 E2F1 produce un aumento en la expresión de proteínas involucradas en la respuesta apoptótica, no necesariamente conduce a su activación. Las caspasas requieren de modificaciones post-traduccionales para convertirse en catalíticamente activas (Boatright and Salvesen 2003). Por lo tanto, E2F1 sensibiliza a la célula a señales pro-apoptóticas (Iaquinta and Lees 2007). Por último, un trabajo ha demostrado la existencia de un co-factor pro-apoptótico de E2F1: Jab1. Este une específicamente a E2F1, siendo dicha unión indispensable para la inducción de apoptosis por E2F1 (Hallstrom and Nevins 2006). En otros contextos, E2F1 es capaz de promover la supervivencia celular frente a la injuria genotóxica. Estudios han indicado la existencia de diversos genes blanco de E2F involucrados en supervivencia celular, activación de puntos de control del ciclo celular y reparación del ADN (Bracken, Ciro et al. 2004; Dimova and Dyson 2005). A su vez, como se mencionó anteriormente, E2F1

se localiza en sitios de lesión al ADN, donde promueve el reclutamiento de factores de reparación, estimulando así la reparación del ADN dañado y la supervivencia celular (Guo, Chen et al. 2010; Chen, Zhu et al. 2011; Guo, Chen et al. 2011).

### 3. Agentes genotóxicos

Las lesiones al ADN pueden deberse a causas endógenas (intracelulares) o exógenas (ambientales). Dentro de los agentes genotóxicos endógenos, se incluyen productos del metabolismo celular tales como especies reactivas de oxígeno (ROS) –derivadas de la respiración oxidativa, reacciones redox y procesos inflamatorios–, errores de apareamiento generados durante la replicación del ADN, e hidrólisis de bases –tales como deaminaciones, depurinaciones y depirimidaciones–. Por otro lado, los agentes genotóxicos exógenos engloban radiación ultravioleta (UV), radiación ionizante, agentes químicos industriales y una diversidad de drogas empleadas en tratamientos de quimioterapia (Jackson and Bartek 2009; Lord and Ashworth 2012).

En esta tesis, las lesiones al ADN en los modelos experimentales utilizados son aquellas generadas por causas endógenas –peróxido de hidrógeno– y exógenas –neocarzinostatina y radiación UV-C–.

#### 3.1. Neocarzinostatina

La neocarzinostatina (NCS) es una droga antitumoral radiomimética obtenida a partir de filtrados de cultivos de *Streptomyces* (Ishida, Miyazaki et al. 1965). La misma está compuesta por un cromóforo lábil unido no-covalentemente a una proteína que lo protege de degradación espontánea en solución acuosa (Goldberg 1987). Su mecanismo de acción implica en primer lugar la unión al ADN en dos pasos: una unión al surco menor, seguida de la intercalación del cromóforo entre bases apareadas –preferentemente T•A– (Dasgupta and Goldberg 1985). A continuación, en presencia de tiol, el cromóforo produce especies biradicales altamente reactivas, las cuales conducen a la oxidación de la desoxirribosa del ADN por abstracción del hidrógeno en las posiciones C-1' o C-4' de una hebra del ADN y en la posición C-5' de la hebra complementaria. De esta manera, la NCS conlleva a la generación de DSBs en secuencias específicas AGT•ACT (5'→3'•5'→3'). También produce roturas simple cadena (SSBs o *single-strand breaks*) en bases A y T, las cuales pueden a su vez dar lugar

a DSBs si se encuentran distanciadas entre sí por pocos nucleótidos (Galat and Goldberg 1990; Smith, Bauer et al. 1994).

### 3.2. *Peróxido de hidrógeno*

El estrés oxidativo, producto de un incremento desmesurado de los niveles celulares de ROS, conduce a la oxidación de bases y SSBs. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es un mediador esencial del estrés oxidativo y un potente agente mutagénico. El mismo es originado por diversas vías metabólicas celulares, como la cadena de transporte de electrones, y por procesos inflamatorios. Si bien el  $H_2O_2$  *per se* es un oxidante débil, su capacidad genotóxica proviene de la reacción de Fenton, en la cual se produce la catálisis del  $H_2O_2$  con metales de transición –generalmente hierro–, dando lugar a radicales altamente reactivos de hidroxilo que conllevan a la generación de daño oxidativo al ADN (Fenton 1894; Henle and Linn 1997).

### 3.3. *Radiación UV*

La luz UV es una radiación electromagnética emitida por el sol (o una fuente artificial), que puede subdividirse en tres segmentos de acuerdo a su longitud de onda: UV-A (320 a 400 nm), UV-B (295 a 320 nm) y UV-C (100 a 295 nm). La energía de la radiación es inversamente proporcional a su longitud de onda, siendo UV-C aquel componente más nocivo del espectro UV. La capa de ozono absorbe hasta 310 nm, impidiendo que la luz UV-C y parte de la UV-B alcancen la superficie terrestre (van der Leun 2004). Aunque la radiación UV-C no tiene un efecto ambiental, es utilizada comúnmente como modelo de daño al ADN debido a que a una longitud de onda de 260 nm la molécula de ADN es el principal cromóforo celular. De esta manera, la exposición a luz UV cataliza la formación de uniones covalentes entre bases pirimidínicas adyacentes. La mayoría (entre un 80-90%) de las lesiones causadas por UV son los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs), mientras que el 10-20% restante son los fotoproductos (6-4) pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Estos aductos voluminosos en el ADN son responsables de distorsionar su estructura helicoidal (Batista, Kaina et al. 2009).

## 4. **Sistemas de reparación del ADN dañado**

La gran variedad de lesiones al ADN requiere de múltiples mecanismos de reparación. A lo largo de la evolución, se han seleccionado diversos sistemas de reparación capaces de detectar la lesión, señalar su presencia y promover su reparación (Harper and



Elledge 2007). La activación de cada sistema depende no solo del tipo de lesión al ADN, sino también de la fase del ciclo celular en la cual ocurre el daño (Branzei and Foiani 2008).

En mamíferos, los principales mecanismos de reparación son los siguientes: reparación por escisión de bases (BER o *base excision repair*), reparación por escisión de nucleótidos (NER o *nucleotide excision repair*), reparación por recombinación homóloga (HR o *homologous recombination*), reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ o *non-homologous end joining*) y reparación de errores de apareamiento (MMR o *mismatch repair*) (Jackson and Bartek 2009; Lord and Ashworth 2012) (Figura V).

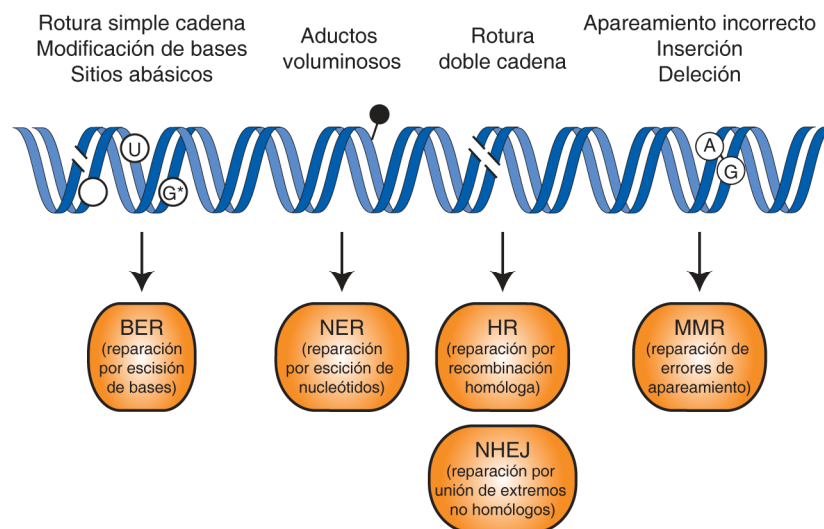
La vía de reparación BER es aquella responsable de la reparación de bases oxidadas y alquiladas, de sitios abásicos generados por depuración espontánea, y de SSBs al ADN. Este sistema quita la base dañada dando lugar a un sitio abásico, el cual es clivado por enzimas específicas originando un SSB. El *gap* generado es removido por la síntesis de nuevo ADN (David, O'Shea et al. 2007; Parsons and Dianov 2013).

A diferencia de BER, cuyas lesiones blanco son aquellas que no afectan el esqueleto del ADN, el mecanismo NER reconoce aductos voluminosos que distorsionan su estructura helicoidal. Este sistema puede ser clasificado en dos subvías de acuerdo al mecanismo de reconocimiento de la lesión: reparación global del genoma (GGR o *global-genome repair*) y reparación acoplada a la transcripción (TCR o *transcription-coupled repair*). GGR es responsable de la reparación de lesiones en las zonas no transcritas del genoma que distorsionan su estructura, mientras que TCR actúa sobre lesiones que bloquean la elongación de la ARN Polimerasa en genes activos transcripcionalmente. Si bien estas subvías difieren en el mecanismo de detección de la lesión al ADN, ambas conllevan a su reparación del mismo modo: escinden una secuencia de 22 a 30 nucleótidos en la hebra del ADN dañado, la cual es luego reemplazada por la maquinaria de replicación (Diderich, Alanazi et al. 2011; Kamileri, Karakasilioti et al. 2012).

Los dos sistemas de reparación encargados de la reparación de DSBs son HR y NHEJ. El mecanismo HR, cuya acción está restringida a las fases S y G2 del ciclo celular, es un proceso conservativo libre de errores dado que utiliza un templado homólogo para la reparación. Luego de la remoción de la porción de la secuencia del ADN correspondiente al sitio de lesión, utiliza como templado la secuencia de la cromátida

hermana para la síntesis del ADN en el sitio de rotura (San Filippo, Sung et al. 2008). En contraste, NHEJ involucra la religación de los extremos del DSB. Este mecanismo, que puede ocurrir en cualquier fase del ciclo celular, es propenso a cometer errores por no utilizar un templado homólogo (Weterings and Chen 2008).

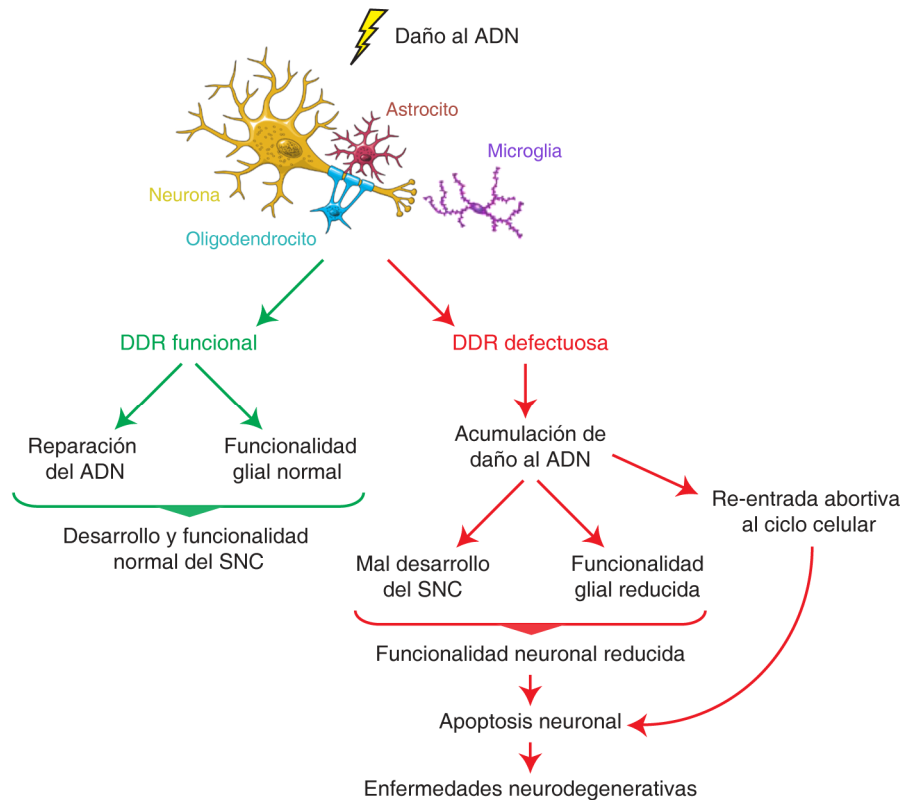
Por último, el mecanismo MMR detecta distorsiones en la estructura helicoidal del ADN causadas por apareamientos de bases incorrectos o *loops* en el ADN generados por inserciones o deleciones durante la replicación del ADN. De esta manera, conduce a la escisión y remoción de la hebra que contiene al sitio de lesión, y a la re-síntesis de una nueva hebra (Jiricny 2006).



**Figura V. Sistemas de reparación.** Lesiones comunes al ADN (parte superior de la figura), y los mecanismos de reparación que se activan para cada tipo de lesión (parte inferior de la figura). Modificado de Diderich, Alanazi et al, 2011; Lord y Ashworth, 2012.

## 5. Daño al ADN y enfermedades neurodegenerativas

Las neuronas maduras son células post-mitóticas altamente diferenciadas que no pueden ser reemplazadas, en su gran mayoría, en caso de trauma o enfermedad. Las mismas poseen una elevada actividad metabólica –acoplada a un consumo excesivo de oxígeno– que produce grandes cantidades de ROS, potenciales agentes dañadores del ADN. Por otro lado, la alta tasa de transcripción y traducción de las neuronas las torna aún más susceptibles a sufrir lesiones en el ADN. Ante estas amenazas, las neuronas cuentan con mecanismos elaborados para mantener la integridad de su genoma, asegurando de esta manera su longevidad y funcionalidad (Halliwell 2006; Barzilai 2007; Fishel, Vasko et al. 2007; Weissman, de Souza-Pinto et al. 2007) (Figura VI).



**Figura VI. Maquinaria de respuesta al daño al ADN en el sistema nervioso central.** Consecuencias de una vía DDR funcional o defectuosa luego de injuria genotóxica en células del sistema nervioso central (SNC). Modificado de Barzilai 2010.

La acumulación de daño al ADN en neuronas sanas conlleva a la activación de la maquinaria DDR, vía que conduce en última instancia al desarrollo normal y funcionamiento correcto del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, una variedad de evidencias han demostrado un rol central de la acumulación de daño al ADN en procesos de envejecimiento en neuronas del SNC y en procesos de neurodegeneración (Katyal and McKinnon 2007). Defectos en la vía DDR están involucrados en la etiología de enfermedades neurodegenerativas de desarrollo tardío, tales como Alzheimer y Parkinson (Rass, Ahel et al. 2007; Kulkarni and Wilson 2008). Aquellas células del SNC con defectos en la maquinaria DDR presentan una acumulación de lesiones en el ADN que resultan en un reducido desarrollo y funcionamiento de las mismas. Esto es debido a dos razones principales. Por un lado, luego de estrés genotóxico, las células neuronales post-mitóticas re-ingresan al ciclo celular con el objetivo de reparar el daño al ADN (Becker and Bonni 2004; Kruman 2004; Yang and Herrup 2007). La disminuida expresión de proteínas de reparación del ADN, característica de enfermedades neurodegenerativas, hace que dicho intento resulte abortivo y culmine en la muerte neuronal por apoptosis (Jacobsen, Beach et al.

2004; Vyjayanti and Rao 2006). Por otro lado, trabajos han señalado la importancia de la integridad de las células de la glia (Kuljis, Xu et al. 1997; Liu, Stoica et al. 2005). Las neuronas, por su estructura y función elaborada, naturaleza post-mitótica, número finito y alto metabolismo, requieren de un ambiente que optimice su funcionamiento. Este es provisto por las células de la glia –astrocitos, oligodendrocitos y microglía–, las cuales son células proliferativas con una elevada capacidad de formar interacciones con una variedad de células y de generar el ambiente homeostático requerido para el correcto funcionamiento de las células neuronales. En este sentido, el desarrollo de desórdenes neurodegenerativos radica en el mal funcionamiento del contexto neuronal-glial (Barzilai 2010).

Los desórdenes neurodegenerativos pueden clasificarse en base a diversos criterios, como edad de inicio, causas genéticas, características clínicas y tipo celular afectado. Alzheimer y Parkinson son típicas enfermedades neurodegenerativas de desarrollo tardío. La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo crónico caracterizado por la pérdida de capacidades cognitivas, severa neurodegeneración y neuroinflamación prominente. Los signos neuropatológicos implican la presencia de placas  $\beta$ -amiloide y ovillos neurofibrilares en áreas del cerebro asociadas con funciones del aprendizaje y la memoria (Krstic and Knuesel 2013). Las placas  $\beta$ -amiloide cumplen un rol crítico en la neuropatogénesis del Alzheimer, ya que se encuentran rodeadas de células de la glía que se activan y producen ROS. Dichas especies inducen o exacerban la neurotoxicidad ya que provocan estrés oxidativo en neuronas hipocampales, corticales y dopaminérgicas (Weiner and Frenkel 2006; Nam, Park et al. 2012; Medeiros and LaFerla 2013). Neuronas de pacientes con Alzheimer han mostrado elevados niveles de SSBs y DSBs, activación del ciclo celular y deficiencias en la maquinaria de reparación NHEJ (Barzilai 2010). Luego de Alzheimer, el segundo desorden neurodegenerativo de desarrollo tardío más frecuente es la enfermedad de Parkinson. La patología principal de dicha enfermedad es la pérdida profunda de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta. Los pacientes presentan principalmente alteraciones en su sistema motor, tales como bradicinesia, rigidez y temblor en reposo, y la inestabilidad postural en etapas más avanzadas de la enfermedad (Coelho and Ferreira 2012). Si bien la causa del desorden de Parkinson no ha sido aún establecida, estudios han demostrado una relación entre la deficiencia de ATM y la progresiva muerte de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra en

ratones *knockout* para ATM. Los mismos presentaron anormalidades motoras, además de un incremento en la producción de ROS y consecuente daño de tipo oxidativo al ADN en las neuronas de dicha región del cerebro (Eilam, Peter et al. 1998; Shackelford, Manuszak et al. 2003).

# Hipótesis y Objetivos

---

La familia de factores de transcripción E2F presenta una gran plasticidad funcional. Además de su conocido rol en la regulación del ciclo celular, varios miembros de la familia han sido implicados en la respuesta al daño al ADN. El miembro mejor caracterizado en relación a dicha respuesta es E2F1. Se sabe que E2F1 sufre modificaciones post-traduccionales que conducen al aumento de su estabilidad luego de injuria genotóxica. Por otro lado, se ha observado el reclutamiento de E2F1 a sitios de lesión al ADN y, además, una regulación diferencial de la capacidad transactivadora de E2F1 luego del tratamiento genotóxico según su asociación con proteínas específicas.

En nuestro laboratorio hemos determinado que la irradiación UV produce un aumento de los niveles de ARNm de *E2F1*, conllevando a un incremento de los niveles proteicos (Carcagno, Ogara et al. 2009). Por lo tanto, existen dos mecanismos que contribuyen a la inducción de E2F1 en respuesta al daño al ADN: las modificaciones post-traduccionales y la consecuente estabilización de la proteína ya sintetizada y, por otro lado, la mayor tasa de transcripción de *E2F1* que conduce a la síntesis proteica *de novo*. Trabajos recientes han demostrado que otros miembros de la familia E2F son inducidos transcripcionalmente luego del tratamiento con el agente quimioterapéutico doxorubicina (Martinez, Goluszko et al. 2010).

### **Hipótesis**

De las observaciones mencionadas se desprende nuestra hipótesis, la cual postula que el incremento de la transcripción de *E2F1* luego de injuria genotóxica es producto del daño al ADN *per se* -y no de las señales gatilladas por un genotóxico en particular-, siendo dicha inducción una respuesta general para distintas especies y tipos de lesión al ADN. De esta manera, los elevados niveles de E2F1 obtenidos por las contribuciones de síntesis *de novo* y estabilización proteica actúan en el mantenimiento de la estabilidad genómica. A su vez, se propone que otros miembros de la familia, tales como E2F2 y E2F3 -que comparten dominios estructurales con E2F1 y exhiben actividades transcripcionales similares-, pueden presentar un comportamiento similar a E2F1 y estar también involucrados en la respuesta al daño al ADN.

Vale señalar que nuestro estudio se basó en un modelo celular neuronal debido a que, como se mencionó anteriormente, las neuronas de pacientes con enfermedades neurodegenerativas -tales como Alzheimer o Parkinson- presentan una disminuida

capacidad de reparación de lesiones al ADN. El establecimiento de factores neuroprotectores y de supervivencia neuronal es clave para la comprensión de la progresión de desórdenes de neurodegeneración por injuria y para el diseño de terapias acordes para su tratamiento.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

El objetivo general de este trabajo consiste en el estudio de la participación de los factores de la familia E2F en el mantenimiento de la integridad genómica en células neuronales, y en la evaluación de su potencial rol como factores de supervivencia neuronal.

A partir de este objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos.

### ***Objetivos específicos***

1. Estudio de la expresión de los miembros de la familia E2F en respuesta al daño al ADN en diversas líneas celulares.
2. Análisis de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de los factores E2F luego de injuria genotóxica.
3. Evaluación de la funcionalidad de la actividad de los factores E2F y su relevancia fisiológica en la respuesta al daño al ADN.



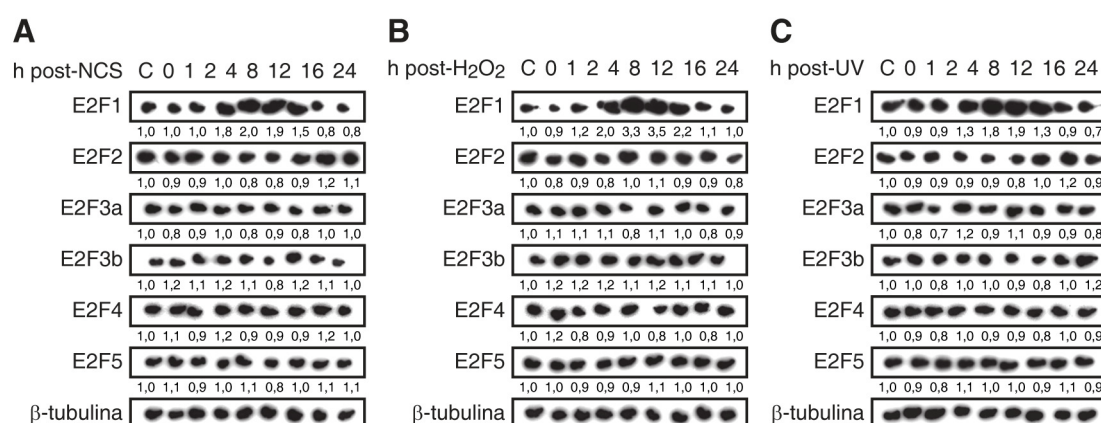
# Resultados



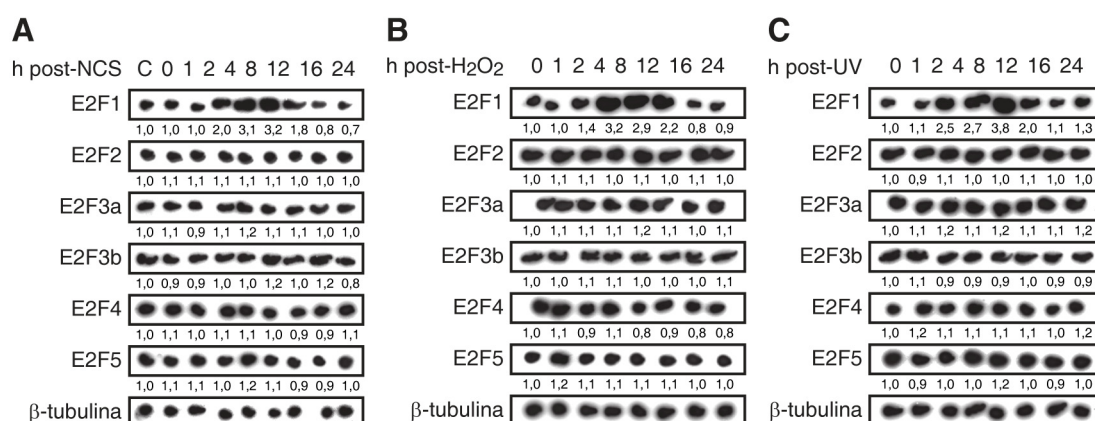
## 1. *E2F1* y *E2F2* son inducidos transcripcionalmente en respuesta al daño al ADN en células neuronales

Con el objeto de evaluar la respuesta de los genes *E2F* al daño al ADN, se determinaron los niveles de ARNm de *E2F1* a *E2F5* a distintos tiempos luego de la acción de diversos agentes genotóxicos mediante ensayos de Northern Blot. Los agentes utilizados, los cuales difieren en su mecanismo de acción y lesión resultante, fueron: neocarzinostatina (NCS), una droga radiomimética que genera daño doble cadena; peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que produce estrés oxidativo y consecuentemente daño simple cadena y oxidación de bases; y, por último, irradiación UV-C (UV), la cual conlleva principalmente a la formación de dímeros de pirimidina ciclobutano. El estudio de los niveles de ARNm de los miembros de la familia *E2F1* a *E2F5* se llevó a cabo en diversas líneas celulares, provenientes de diferentes tejidos y especies.

Ensayos de Northern Blot en células de hepatocarcinoma humano HepG2 mostraron un aumento de los niveles de ARNm de *E2F1* luego del tratamiento con cualquiera de los genotóxicos empleados (Figura 1). Dicho aumento no fue detectado en los miembros restantes estudiados. Por otro lado, el patrón de aumento del ARNm exclusivo de *E2F1* fue también observado en células humanas embrionarias de riñón HEK293 (Figura 2).

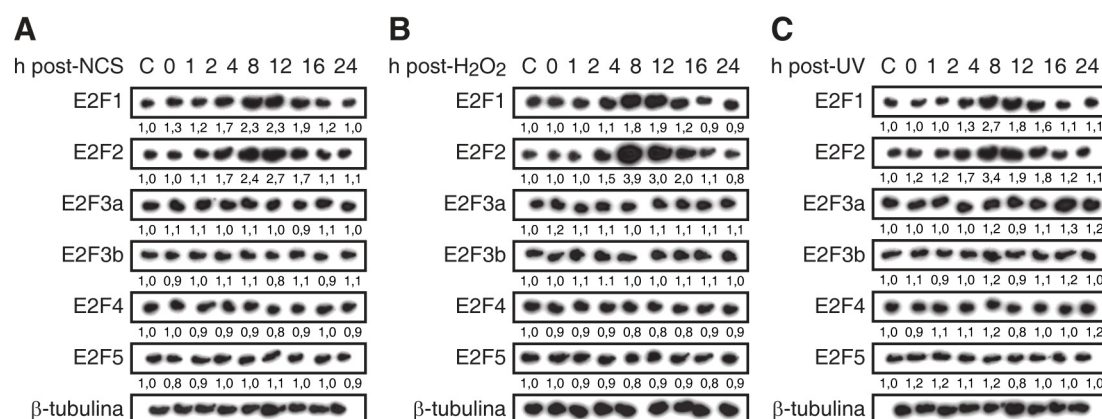


**Figura 1. Aumento de los niveles de ARNm de *E2F1* en respuesta a estrés genotóxico en células HepG2.** Northern Blot para *E2F1*-*E2F5* en células de hepatocarcinoma humano HepG2 tratadas con (A) NCS, (B)  $H_2O_2$  o (C) UV, y cosechadas a los tiempos indicados. Se usó  $\beta$ -tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1*-*E2F5* relativizada a la  $\beta$ -tubulina y a la condición control. C, células control.

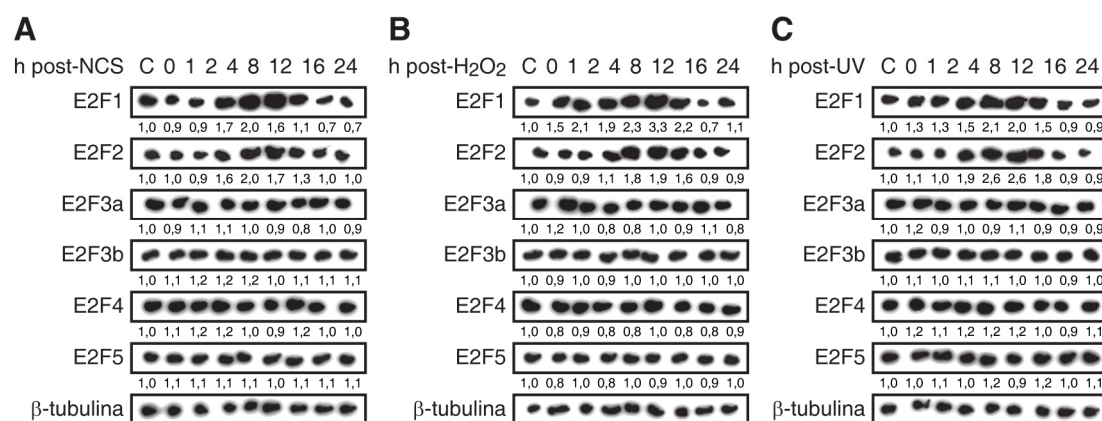


**Figura 2. Aumento de los niveles de ARNm de *E2F1* por daño al ADN en células HEK293.** Northern Blot para *E2F1-E2F5* en células embrionarias de riñón humano HEK293 tratadas con (A) NCS, (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o (C) UV, y cosechadas a los tiempos indicados. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1-E2F5* relativizada a la β-tubulina y a la condición control. C, células control.

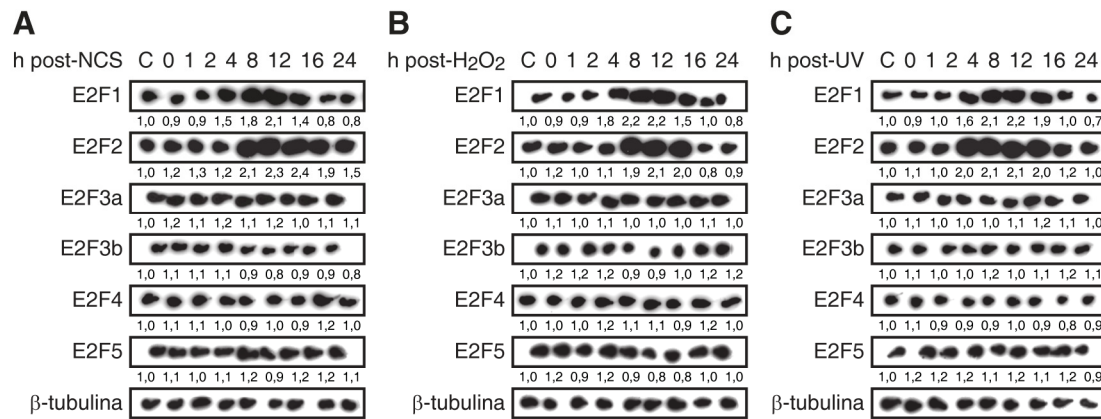
A continuación, se realizó el mismo tipo de análisis, pero en líneas celulares de origen neuronal. Esto se debe al particular interés en este tipo celular, dado que se sabe que el daño al ADN es un factor causal de enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer o Parkinson, en las cuales los pacientes poseen una deficiencia en la reparación del ADN en sus tejidos neuronales (McKinnon 2009). Se demostró que, en respuesta al tratamiento con cualquiera de los agentes genotóxicos ensayados, hay un aumento en la expresión de los ARNm de *E2F1* y *E2F2* en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Figura 3). Dicho patrón fue también observado en células de neuroblastoma murino Neuro-2a (Figura 4), células híbridas de hipocampo y neuroblastoma de ratón HN9 (Figura 5) y células de feocromocitoma de médula adrenal de rata PC12 (Figura 6). Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran un aumento de los niveles del ARNm de *E2F1* en todos los tipos celulares luego del daño al ADN, mientras que el incremento del ARNm de *E2F2* estaría restringido al tipo celular neuronal. Con el objetivo de reforzar dicha observación, se llevó a cabo un ensayo de Northern Blot para estudiar los niveles de ARNm de *E2F1* a *E2F5* en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata sometidos a irradiación UV y cosechados a distintos tiempos post-irradiación. Nuevamente, se determinó un incremento de los niveles de ARNm de *E2F1* y *E2F2* en respuesta al daño al ADN (Figura 7), confirmando que el aumento del transcripto de *E2F2* es exclusivo de células neuronales.



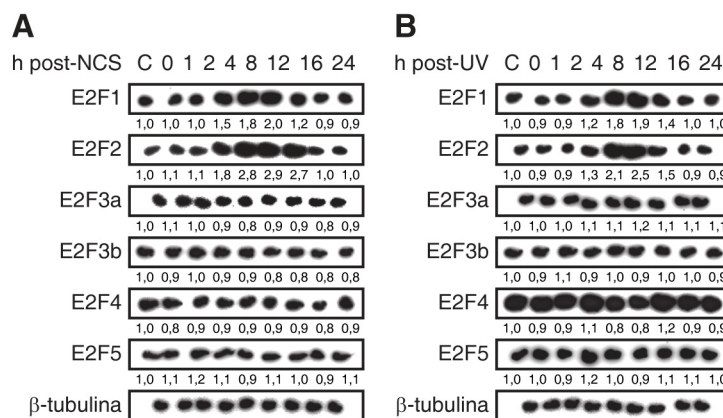
**Figura 3. Aumento de los niveles de ARNm de *E2F1* y *E2F2* en respuesta a injuria genotóxica en células SH-SY5Y.** Northern Blot para *E2F1-E2F5* en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas con (A) NCS, (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o (C) UV, y cosechadas a los tiempos indicados. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1-E2F5* relativizada a la β-tubulina y a la condición control. C, células control.



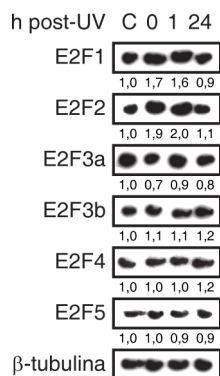
**Figura 4. Aumento de los niveles de ARNm de *E2F1* y *E2F2* por estrés genotóxico en células Neuro-2a.** Northern Blot para *E2F1-E2F5* en células de neuroblastoma murino Neuro-2a tratadas con (A) NCS, (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o (C) UV, y cosechadas a los tiempos indicados. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1-E2F5* relativizada a la β-tubulina y a la condición control. C, células control.



**Figura 5. Aumento de los niveles de ARNm de *E2F1* y *E2F2* en respuesta al daño al ADN en células HN9.** Northern Blot para *E2F1*-*E2F5* en células híbridas de hipocampo y neuroblastoma de ratón HN9 tratadas con (A) NCS, (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o (C) UV, y cosechadas a los tiempos indicados. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1*-*E2F5* relativizada a la β-tubulina y a la condición control. C, células control.

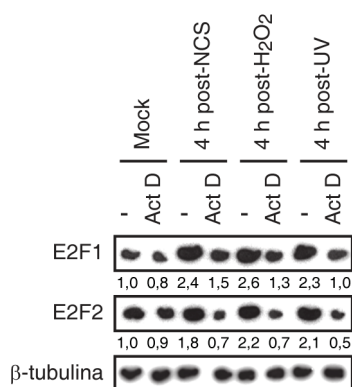


**Figura 6. Aumento de los niveles de ARNm de *E2F1* y *E2F2* por estrés genotóxico en células PC12.** Northern Blot para *E2F1*-*E2F5* en células de feocromocitoma de médula adrenal de rata PC12 tratadas con (A) NCS o (B) UV, y cosechadas a los tiempos indicados. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1*-*E2F5* relativizada a la β-tubulina y a la condición control. C, células control.



**Figura 7. Aumento de los niveles de ARNm de *E2F1* y *E2F2* en respuesta a irradiación UV en cultivos primarios de neuronas hipocámpales de rata.** Northern Blot para *E2F1*-*E2F5* en cultivos primarios de neuronas hipocámpales de rata sometidos a irradiación UV y cosechados a los tiempos indicados. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1*-*E2F5* relativizada a la β-tubulina y a la condición control. C, células control.

El incremento del ARNm de *E2F1* y *E2F2* observado luego de un estrés genotóxico puede ser consecuencia de una mayor tasa de transcripción del gen, o bien producto de una estabilización del transcripto. Para descartar esta última posibilidad, se estudió el efecto de bloquear la transcripción mediante el tratamiento con actinomicina D. La actinomicina D es un antibiótico polipeptídico que inhibe la transcripción del ADN al unirse a este en el complejo de iniciación de la transcripción, evitando así la elongación por la ARN Polimerasa (Sobell 1985). De esta manera, se realizaron ensayos de Northern Blot para determinar los niveles de ARNm de *E2F1* y *E2F2* en células SH-SY5Y pre-incubadas durante 3 horas con actinomicina D, sometidas a daño al ADN con cualquiera de los agentes genotóxicos y cosechadas 4 horas post-tratamiento genotóxico, es decir, en aquel punto temporal en el que se habían observado máximos niveles de transcripto (ver Figura 3). La inhibición de la transcripción previno la acumulación del ARNm de *E2F1* y *E2F2* en respuesta al daño al ADN (Figura 8), sugiriendo que el aumento del transcripto de *E2F1* y *E2F2* producto de estrés genotóxico es debido a una mayor tasa de transcripción del gen.



**Figura 8. El aumento del ARNm de *E2F1* y *E2F2* por estrés genotóxico es producto de la inducción transcripcional del gen.** Northern Blot para *E2F1* y *E2F2* en células SH-SY5Y pre-incubadas 3 horas con Actinomicina D (Act D), sometidas al tratamiento con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV, y cosechadas 4 horas después. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1* y *E2F2* relativizada a la β-tubulina y a la condición Mock (-).

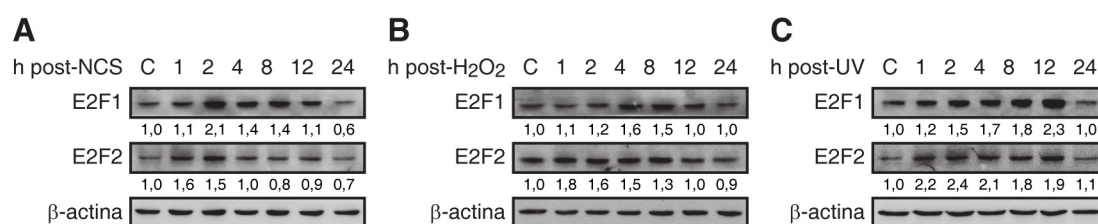
En conclusión, los resultados presentados demuestran que tras daño al ADN ocurre una inducción transcripcional de *E2F1* en todos los tipos celulares y, además, de *E2F2* específicamente en células de tipo neuronal. Este efecto sería independiente del tipo de daño generado y especie analizada, como se propuso primeramente en nuestra hipótesis.

## 2. *E2F1* y *E2F2* son sintetizados *de novo* luego del tratamiento genotóxico en células neuronales

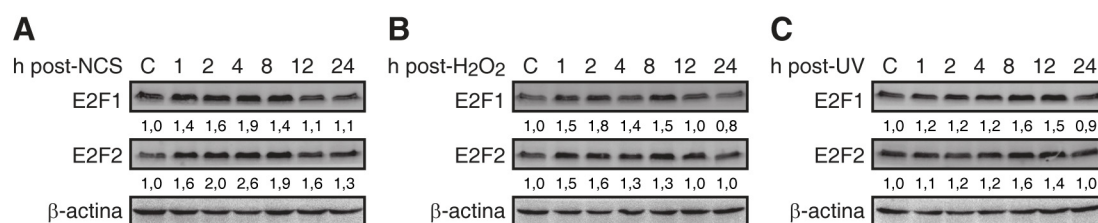
Considerando la inducción transcripcional de los genes de *E2F1* y *E2F2* observada en respuesta al daño al ADN, se estudió si los elevados niveles de ARNm de *E2F1* y *E2F2*



se reflejan en un aumento de los niveles proteicos. Con este objetivo, se realizaron ensayos de Western Blot en células SH-SY5Y para detectar los niveles de E2F1 y E2F2 a distintos tiempos luego de la acción de los genotóxicos. Se observó un incremento de los niveles de ambas proteínas en respuesta a cualquiera de los agentes dañadores utilizados (Figura 9). Este patrón de incremento de E2F1 y E2F2 luego del daño al ADN fue también detectado en células HEK293 (Figura 10).



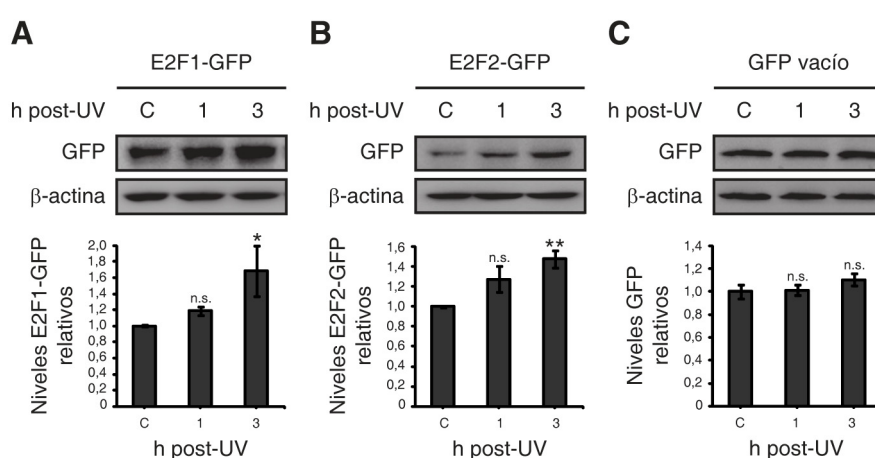
**Figura 9. Aumento de los niveles proteicos de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN en células SH-SY5Y.** Western Blot para E2F1 y E2F2 en células SH-SY5Y tratadas con (A) NCS, (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o (C) UV, y cosechadas a los tiempos indicados. Se usó β-actina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para E2F1 y E2F2 relativizada a la β-actina y a la condición control. C, células control.



**Figura 10. Aumento de los niveles proteicos de E2F1 y E2F2 por injuria genotóxica en células HEK293.** Western Blot para E2F1 y E2F2 en células HEK293 tratadas con (A) NCS, (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o (C) UV, y cosechadas a los tiempos indicados. Se usó β-actina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para E2F1 y E2F2 relativizada a la β-actina y a la condición control. C, células control.

Si bien el aumento de E2F1 era esperable por la inducción transcripcional observada y la estabilización proteica previamente reportada (Lin, Lin et al. 2001; Stevens, Smith et al. 2003; Ianari, Gallo et al. 2004), el incremento de E2F2 fue sorprendente debido a que se observó no solo en células neuronales, sino también en la línea HEK293, en la cual no se había detectado una inducción del ARNm de E2F2 (ver Figura 2). Estos resultados sugieren una posible estabilización de la proteína por modificaciones post-traduccionales como consecuencia del daño al ADN. Con el fin de evaluar dicha posibilidad, se determinó si una proteína E2F2 de expresión exógena es estabilizada por irradiación UV. Se llevaron a cabo ensayos de Western Blot en células SH-SY5Y cosechadas a distintos tiempos post-irradiación UV, las cuales fueron previamente

transfectadas con vectores de expresión E2F1-GFP o E2F2-GFP. La detección de la proteína exógena mediante un anticuerpo anti-GFP mostró un aumento significativo de los niveles proteicos de ambas proteínas en respuesta al daño al ADN (Figura 11A,B). Dado que la expresión de dichas proteínas E2F fusionadas al *tag* GFP está regida por un promotor que no es responsivo a luz UV (Figura 11C), los resultados sugieren que existe un mecanismo de estabilización post-traducciona responsable del aumento de los niveles de E2F2 en respuesta al daño al ADN y, por otro lado, confirman aquella estabilización de E2F1 por estrés genotóxico previamente reportada (Lin, Lin et al. 2001; Stevens, Smith et al. 2003; Ianari, Gallo et al. 2004).

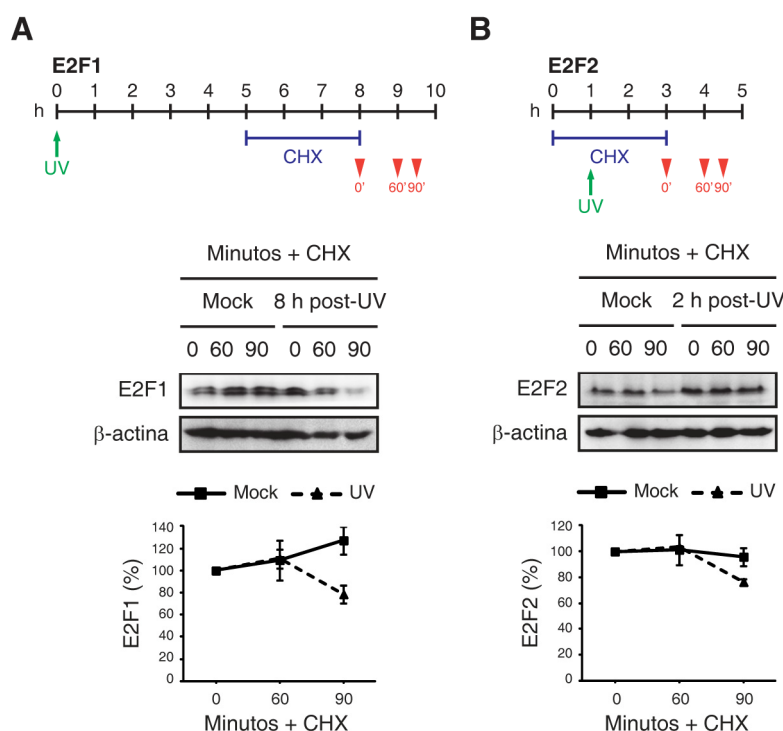


**Figura 11. E2F1 y E2F2 son estabilizados por irradiación UV.** Western Blot para GFP en células SH-SY5Y transfectadas con (A) E2F1-GFP, (B) E2F2-GFP o (C) el vector pEGFP-C1 vacío, y cosechadas a distintos tiempos luego de irradiación UV. Se usó  $\beta$ -actina como control de carga. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro ensayos independientes para (A,B) o tres ensayos independientes para (C). Los valores P fueron obtenidos a partir de un análisis de ANOVA de un factor seguido por un test de Dunnett: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; n.s. no significativo.

A continuación, con el fin de determinar si el incremento de los niveles de E2F1 y E2F2 producto de la acción genotóxica es también consecuencia de síntesis proteica *de novo*, se analizó el efecto de bloquear dicho proceso mediante el tratamiento con cicloheximida. La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis proteica en eucariotas, cuya acción es ejercida al interferir con la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando así la elongación traducciona (Ennis and Lubin 1964). De esta manera, se llevaron a cabo ensayos de Western Blot para E2F1 y E2F2 en células SH-SY5Y pre-incubadas 3 horas con cicloheximida, expuestas a irradiación a placa abierta con UV y cosechadas 0, 30 o 60 minutos después del tiempo correspondiente a los máximos niveles proteicos post-UV para cada proteína: 8 horas para E2F1 y 2 horas para E2F2. El objetivo de este diseño experimental consistió en que la síntesis proteica



estuviera inhibida justamente en el rango de tiempo correspondiente al comienzo de la inducción de la proteína. La inhibición de la síntesis proteica bloqueó el incremento de los niveles proteicos de E2F1 y E2F2 en respuesta a la irradiación UV (Figura 12), sugiriendo que ambas proteínas sufren síntesis *de novo* como consecuencia del daño al ADN. El aumento de los niveles de E2F1 en las células *mock* puede deberse a un efecto inespecífico de estabilización de transcritos producido por la cicloheximida (Dogra, Hahn et al. 1993).

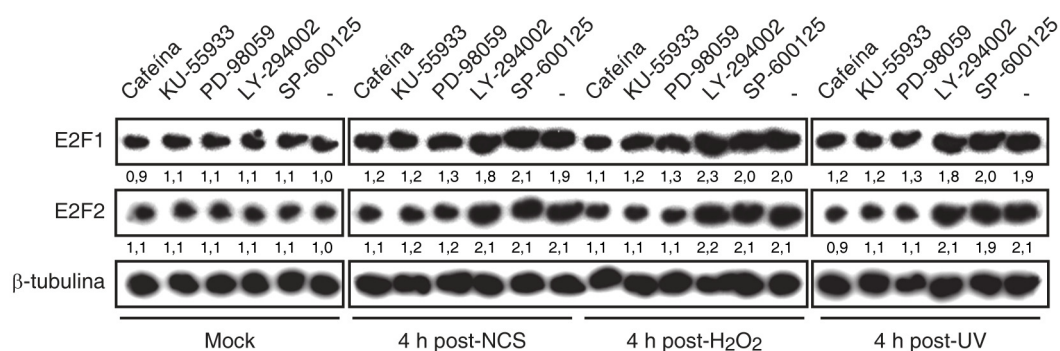


**Figura 12. E2F1 y E2F2 son sintetizados *de novo* en respuesta a irradiación UV.** Western Blot para (A) E2F1 y (B) E2F2 en células SH-SY5Y pre-incubadas 3 horas con cicloheximida (CHX), irradiadas con luz UV y cosechadas a los tiempos indicados por los esquemas en los paneles superiores. Se usó β-actina como control de carga. Los datos representan la media±S.E.M. de tres ensayos independientes.

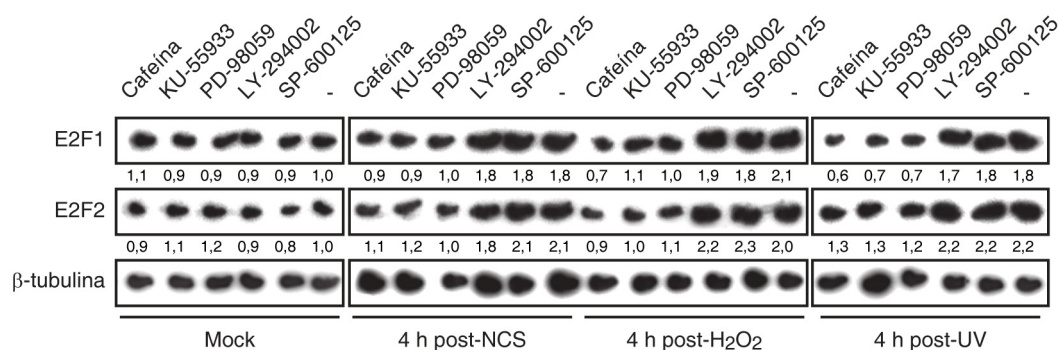
Por lo tanto, en conjunto, los resultados demuestran un aumento de los niveles proteicos de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN. Vale señalar que la estabilización temprana de E2F1 y E2F2 explica el aumento de los niveles proteicos en un punto temporal previo a la inducción transcripcional del gen. Es posible que el aumento sostenido de E2F1 y E2F2 esté dado por dos contribuciones en el tiempo: una estabilización proteica por mecanismos post-traduccionales, seguida de un aumento de la síntesis *de novo* de la proteína producto de la traducción de los elevados niveles de ARNm.

### 3. La inducción transcripcional de *E2F1* y *E2F2* en respuesta a estrés genotóxico requiere de la actividad de las quinasas ATM/ATR y MEK

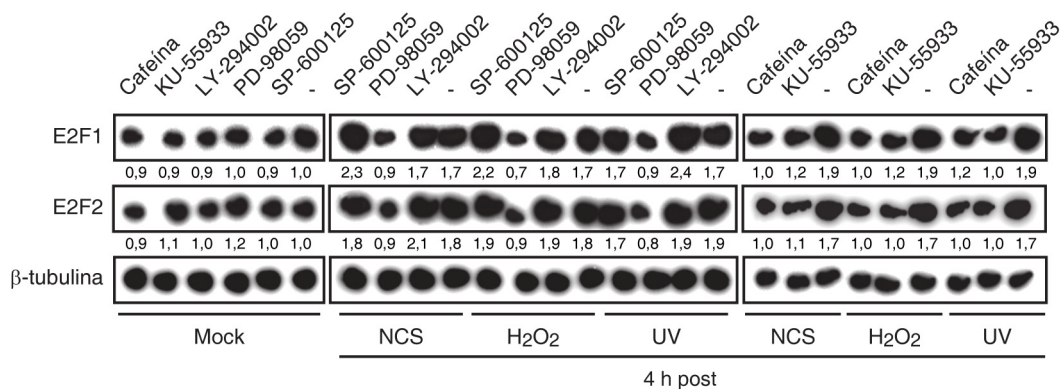
La respuesta celular a la inestabilidad genómica implica la activación de múltiples cascadas de transducción de señales. Con el objetivo de determinar cuáles son aquellas vías responsables del incremento del ARNm de *E2F1* y *E2F2* luego del daño al ADN, se realizaron ensayos de Northern Blot en células SH-SY5Y sometidas al tratamiento con los tres tipos de agentes genotóxicos luego de una incubación durante 2 horas con inhibidores específicos de diversas vías de señalización, y cosechadas al tiempo correspondiente al máximo de inducción previamente observado para los transcripts de *E2F1* y *E2F2*: 4 horas post-daño. Los inhibidores utilizados fueron cafeína, inhibidor de las vías ATM/ATR; KU-55933, inhibidor de la vía ATM; PD-98059, inhibidor de la vía MEK; LY-294002, inhibidor de la vía PI3K; y, finalmente, SP-600125, inhibidor de la vía JNK. Se observó que la pre-incubación con cafeína, KU-55933 y PD-98059 evitó la inducción transcripcional de *E2F1* y *E2F2* para cualquiera de los agentes genotóxicos utilizados (Figura 13). La pre-incubación con los inhibidores LY-294002 y SP-600125 no afectó el aumento de los niveles de ARNm de *E2F1* y *E2F2* en respuesta al daño al ADN. Este patrón fue también obtenido en células Neuro-2a (Figura 14) y HN9 (Figura 15). Por lo tanto, el conjunto de los resultados sugieren que la inducción transcripcional de *E2F1* y *E2F2* por estrés genotóxico en células neuronales requiere de la actividad de las quinasas ATM/ATR y MEK.



**Figura 13. La inducción transcripcional de *E2F1* y *E2F2* en respuesta al daño al ADN en células SH-SY5Y requiere de la actividad de las quinasas ATM/ATR y MEK.** Northern Blot para *E2F1* y *E2F2* en células SH-SY5Y pre-incubadas 2 horas con cafeína, KU-55933, PD-98059, LY-294002 o SP-600125, y cosechadas 4 horas luego del tratamiento con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1* y *E2F2* relativizada a la β-tubulina y a la condición Mock (-).



**Figura 14. La inducción transcripcional de *E2F1* y *E2F2* por injuria genotóxica en células Neuro-2a requiere de la actividad de las quinasas ATM/ATR y MEK.** Northern Blot para *E2F1* y *E2F2* en células Neuro-2a pre-incubadas 2 horas con cafeína, KU-55933, PD-98059, LY-294002 o SP-600125, y cosechadas 4 horas luego del tratamiento con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1* y *E2F2* relativizada a la β-tubulina y a la condición Mock (-).

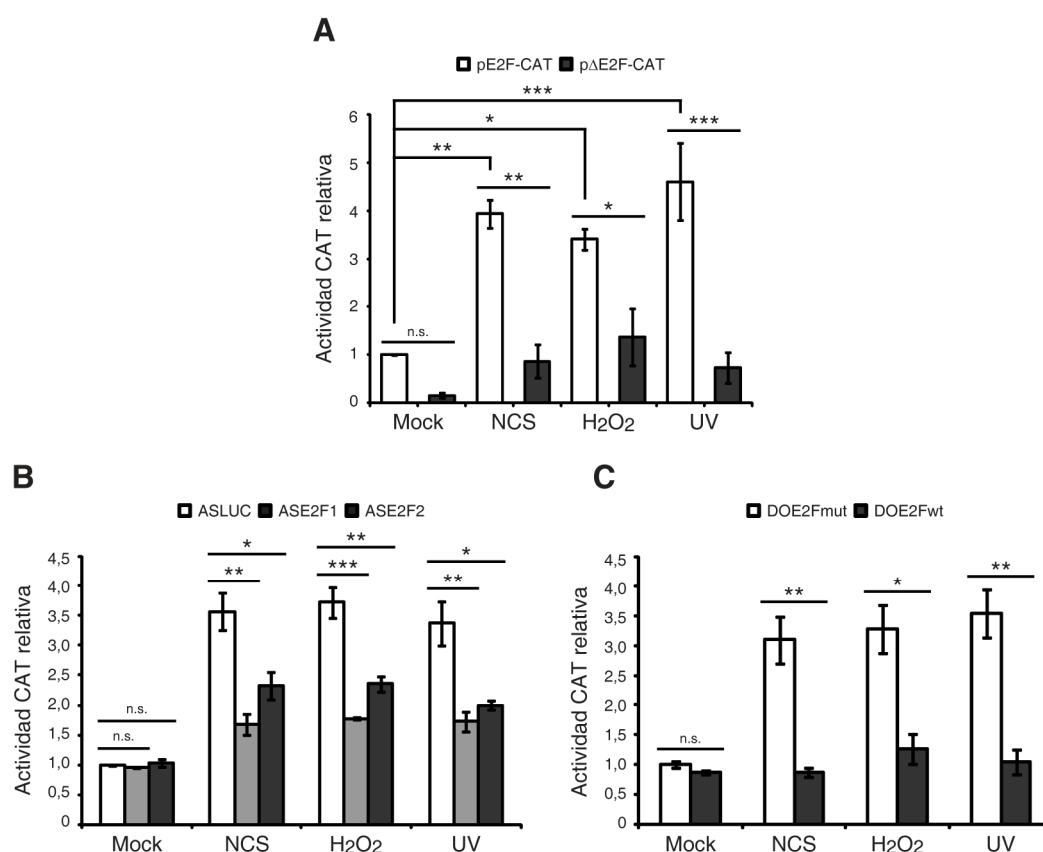


**Figura 15. La inducción transcripcional de *E2F1* y *E2F2* por daño al ADN en células HN9 requiere de la actividad de las quinasas ATM/ATR y MEK.** Northern Blot para *E2F1* y *E2F2* en células HN9 pre-incubadas 2 horas con cafeína, KU-55933, PD-98059, LY-294002 o SP-600125, y cosechadas 4 horas luego del tratamiento con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para *E2F1* y *E2F2* relativizada a la β-tubulina y a la condición Mock (-).

#### 4. *E2F1* y *E2F2* inducidos por daño al ADN son activos en sus funciones reguladoras de la transcripción

Con el objetivo de determinar si las proteínas *E2F1* y *E2F2* inducidas por daño al ADN son activas en sus funciones reguladoras de la transcripción, estudiamos el efecto del tratamiento genotóxico sobre la capacidad transactivacional de dichos factores. Para ello, llevamos a cabo ensayos de actividad reportera de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en células Neuro-2a transfectadas con los plásmidos p*E2F*-CAT o pΔ*E2F*-CAT, y sometidas al tratamiento con los agentes genotóxicos. El plásmido p*E2F*-CAT contiene cuatro sitios consenso de unión para *E2F wild type* río arriba del gen reportero, mientras

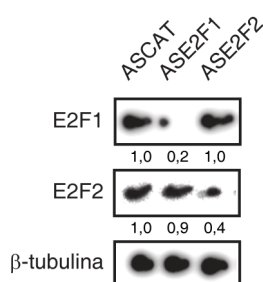
que en el plásmido p $\Delta$ E2F-CAT dichos sitios se encuentran mutados (Hiebert, Chellappan et al. 1992). Con los tres agentes genotóxicos utilizados se observó un aumento de la actividad reportera de pE2F-CAT respecto a las células *mock* (Figura 16A), indicando que hay un incremento en la actividad transactivacional de los factores E2F en respuesta al daño al ADN.



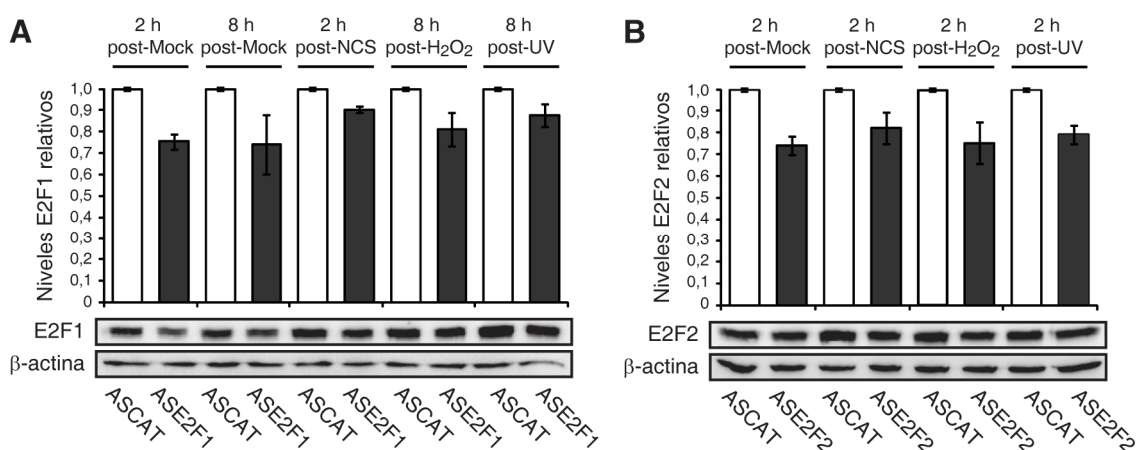
**Figura 16. E2F1 y E2F2 inducidos por daño al ADN son transcripcionalmente activos.** (A) Ensayo de actividad CAT de células Neuro-2a transfectadas con pE2F-CAT o p $\Delta$ E2F-CAT junto con pCEFL- $\beta$ -galactosidasa, y cosechadas 24 horas post-tratamiento con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV. (B-C) Ensayo de actividad CAT de células Neuro-2a transfectadas con pE2F-CAT, pCEFL- $\beta$ -galactosidasa y (B) ASLUC, ASE2F1 o ASE2F2 o (C) DOE2Fmut o DOE2Fwt, y cosechadas 24 horas post-tratamiento con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV. La actividad CAT se normalizó en todos los casos a la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados están expresados relativos a las células Mock-pE2F-CAT en (A), a las células Mock-ASLUC en (B) y a las células Mock-DOE2Fmut en (C). Los datos representan la media $\pm$ S.E.M. de tres ensayos independientes realizados por triplicado. Los valores P fueron obtenidos a partir de un análisis de ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey en (A) o de Dunnett en (B), o bien a partir de un test  $\tau$ -student en (C): \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; n.s. no significativo.

En consecuencia, con el fin de discriminar las contribuciones de la síntesis *de novo* de aquella de estabilización proteica de E2F1 y E2F2 a esta elevada capacidad transactivacional luego de estrés genotóxico, utilizamos como herramientas oligodeoxinucleótidos (ODNs) antisentido y *decoy* de E2F1 y E2F2. Los ODNs antisentido de E2F1 y E2F2 -ASE2F1 y ASE2F2 respectivamente- bloquean la traducción de los transcritos de dichos genes, anulando consecuentemente la vía de síntesis *de novo* de la proteína. Por otro lado, el ODN *decoy* de E2F -DOE2Fwt- secuestra los factores E2F e impide que ejerzan su acción sobre sus genes blanco, anulando de esta manera ambas contribuciones: la estabilización proteica y la síntesis *de novo*. Al medir la actividad CAT en células Neuro-2a transfectadas con el plásmido pE2F-CAT junto con los ODNs antisentido o *decoy*, observamos que en respuesta a cualquiera de los agentes genotóxicos utilizados, la capacidad transactivacional de E2F se vio reducida en presencia de ASE2F1 y ASE2F2 y, en mayor medida, en presencia de DOE2Fwt (Figura 16B,C). Estos resultados indican que los *pools* de E2F1 y E2F2 provenientes tanto de la inducción transcripcional y consecuente síntesis *de novo* como de la estabilización proteica, contribuyen a la incrementada capacidad transactivacional de tales factores luego de la injuria genotóxica.

Vale señalar que la efectividad de los ODNs antisentido de E2F1 y E2F2 se evaluó a nivel de ARNm y de proteínas. En primer lugar, para estudiar el efecto de ASE2F1 y ASE2F2 sobre los niveles de transcripto, se realizaron ensayos de Northern Blot en células SH-SY5Y transfectadas con dichos ODNs. Se determinó que los ODNs ASE2F1 y ASE2F2 son efectivos en disminuir los niveles del ARNm de E2F1 y E2F2 respectivamente (Figura 17). En segundo lugar, se evaluó el efecto de ASE2F1 y ASE2F2 sobre los niveles proteicos de E2F1 y E2F2. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de Western Blot en células SH-SY5Y transfectadas con ASE2F1 o ASE2F2, sometidas a tratamiento genotóxico y cosechadas a los tiempos correspondientes a los máximos niveles proteicos post-daño previamente determinados para cada proteína (ver Figura 9). Si bien el efecto de los ODNs ASE2F1 y ASE2F2 no resultó significativo, se determinó que los mismos presentan una tendencia en disminuir los niveles de la proteína correspondiente (Figura 18). A su vez, se observó que dicha disminución es menor en células dañadas con cualquiera de los agentes genotóxicos utilizados respecto a las células *mock*, lo cual corroboraría el componente de estabilización proteica.



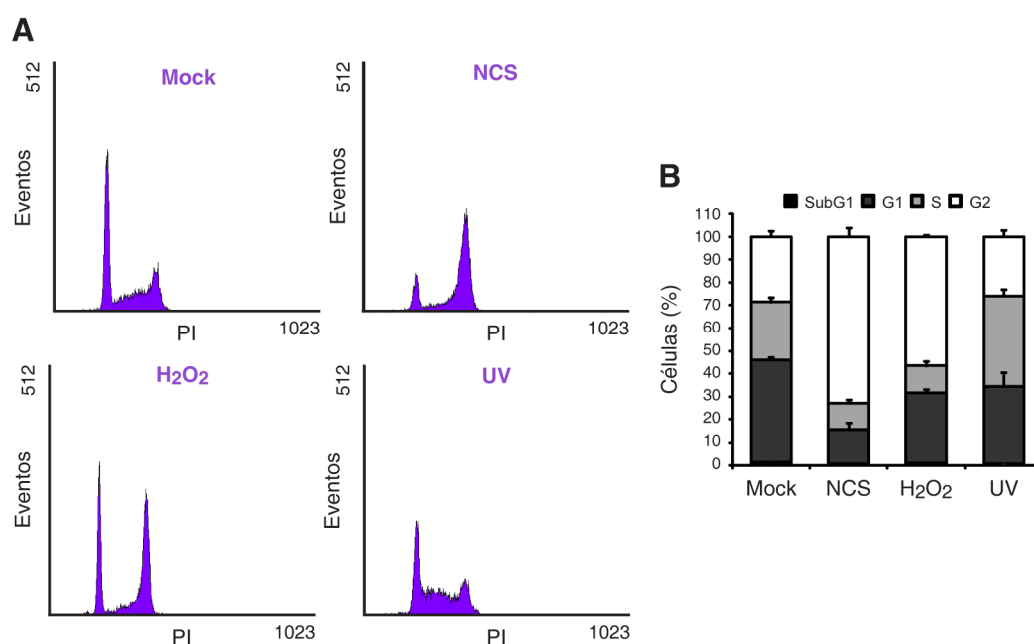
**Figura 17. Los ODNs antisentido de E2F1 y E2F2 son eficientes en disminuir los niveles de ARNm de E2F1 y E2F2 respectivamente.** Northern Blot para E2F1 y E2F2 en células SH-SY5Y transfectadas con ASCAT, ASE2F1 o ASE2F2, y cosechadas 18 horas después. Se usó β-tubulina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para E2F1 y E2F2 relativizada a la β-tubulina y a la condición ASCAT.



**Figura 18. Los ODNs antisentido de E2F1 y E2F2 son eficientes en disminuir los niveles proteicos de E2F1 y E2F2 respectivamente.** Western Blot para E2F1 y E2F2 en células SH-SY5Y transfectadas con ASCAT, ASE2F1 o ASE2F2, y cosechadas a los tiempos post-tratamiento genotóxico indicados. Se usó β-actina como control de carga. Los datos representan la media±S.E.M. de cuatro ensayos independientes, y están expresados relativos a la condición ASCAT para cada tratamiento.

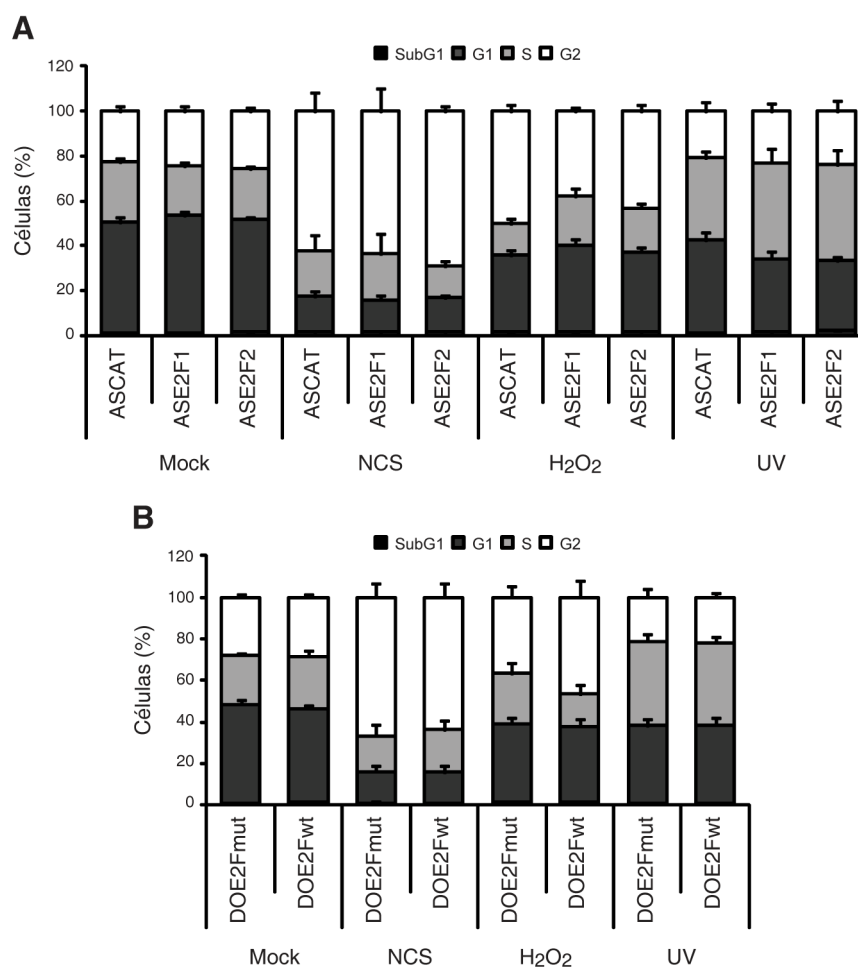
## 5. La inducción de E2F1 y E2F2 por estrés genotóxico no afecta el ciclo celular

Los factores de transcripción de la familia E2F son importantes reguladores del ciclo celular (Chen, Tsai et al. 2009). Con el objetivo de determinar si la inducción de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN afecta dicho proceso, se analizaron posibles cambios en las fases del ciclo celular luego de estrés genotóxico al bloquear tal inducción con ODNs antisentido o *decoy*. En primer lugar, se determinaron los cambios en el ciclo celular en células SH-SY5Y tratadas con cualquiera de los agentes genotóxicos y cosechadas 24 horas después para ser fijadas, teñidas con ioduro de propidio y analizadas mediante citometría de flujo. Se observó un acentuado arresto en G2 luego del tratamiento con NCS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y un marcado arresto en S tras irradiación UV (Figura 19).



**Figura 19.** El tratamiento con NCS o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o la irradiación UV, conllevan al arresto del ciclo celular en las fases G2 o S respectivamente en células Neuro-2a. **(A)** Análisis de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo en células Neuro-2a fijadas 24 horas post-tratamiento con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV y teñidas con yoduro de propidio (PI). **(B)** Cuantificación de los porcentajes de células obtenidos para cada fase del ciclo celular. Los datos representan la media±S.E.M. de cuatro ensayos independientes.

A continuación, se realizó el mismo procedimiento, pero habiendo transfectado las células con ASE2F1, ASE2F2 o DOE2Fwt previo al tratamiento genotóxico. No se observaron cambios significativos en los porcentajes de las fases del ciclo celular luego de la acción de los agentes genotóxicos al haber bloqueado la contribución de la síntesis *de novo* con los ODNs antisentido, o bien las contribuciones de síntesis *de novo* y estabilización proteica con el ODN *decoy* (Figura 20). Por lo tanto, los resultados indican que la inducción de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN no afecta los cambios producidos en las fases del ciclo celular por cualquiera de los agentes genotóxicos utilizados.



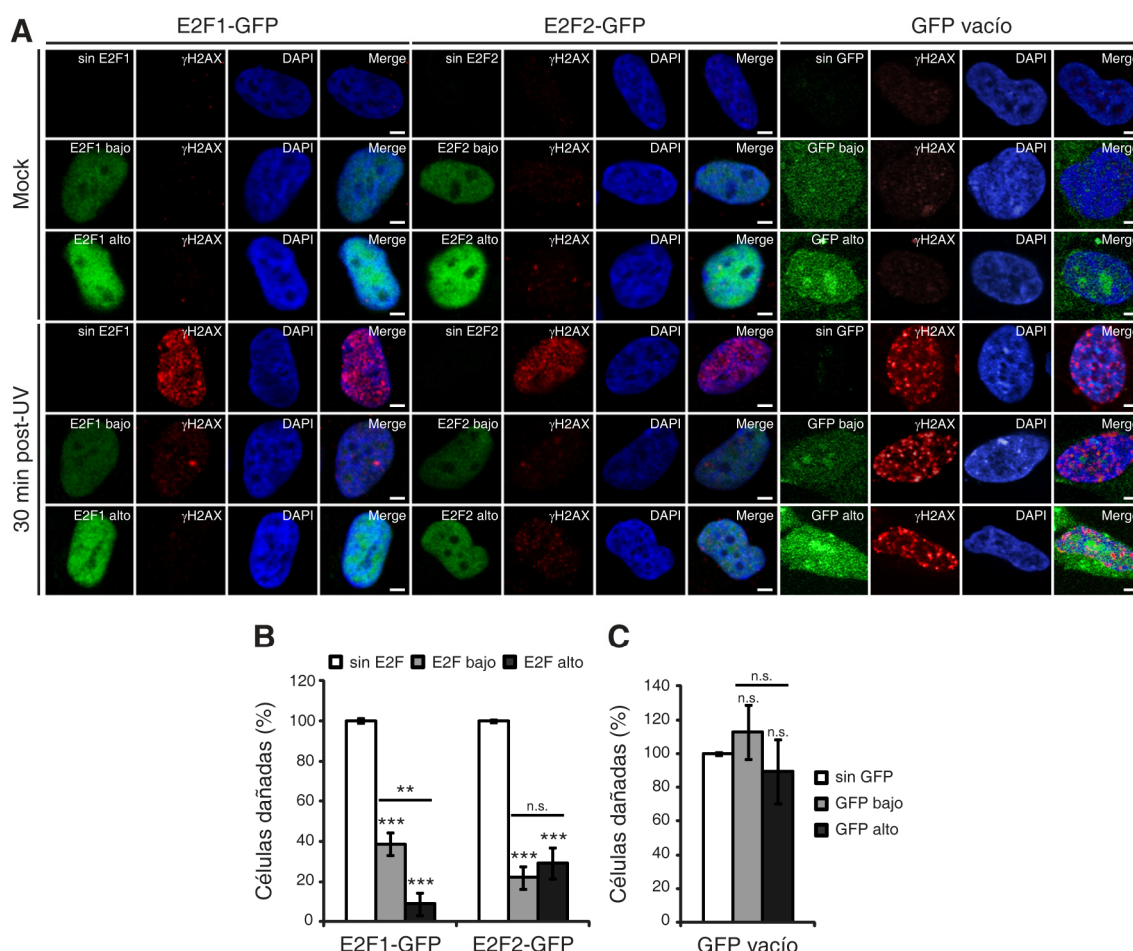
**Figura 20. La inducción de E2F1 y E2F2 no afecta los cambios en las fases del ciclo celular generados por injuria genotóxica.** Análisis de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo en células Neuro-2a transfectadas con **(A)** ASCAT, ASE2F1 o ASE2F2 o **(B)** DOE2Fmut o DOE2Fwt, fijadas 24 horas post-tratamiento genotóxico y teñidas con ioduro de propidio (PI). Se muestra la cuantificación de los porcentajes de células obtenidos para cada fase del ciclo celular. Los datos representan la media±S.E.M. de cuatro ensayos independientes.

## 6. La inducción de E2F1 y E2F2 previene la acumulación de daño al ADN en respuesta a estrés genotóxico

El conjunto de los resultados hasta aquí obtenidos sugieren un rol funcional de E2F1 y E2F2 en la respuesta al daño al ADN en células neuronales. Con el objetivo de determinar si la inducción observada para E2F1 y E2F2 como consecuencia de la injuria genotóxica afecta los niveles de daño al ADN, se midió la intensidad de fluorescencia de  $\gamma$ H2AX por microscopía confocal luego de estrés genotóxico en células SH-SY5Y que sobreexpresaran E2F1 o E2F2. La fosforilación de la histona H2AX en Ser139 es un conocido marcador de injuria genómica (Sharma, Singh et al. 2012). De esta manera, las células fueron transfecadas con los vectores E2F1-GFP, E2F2-GFP o el vector GFP



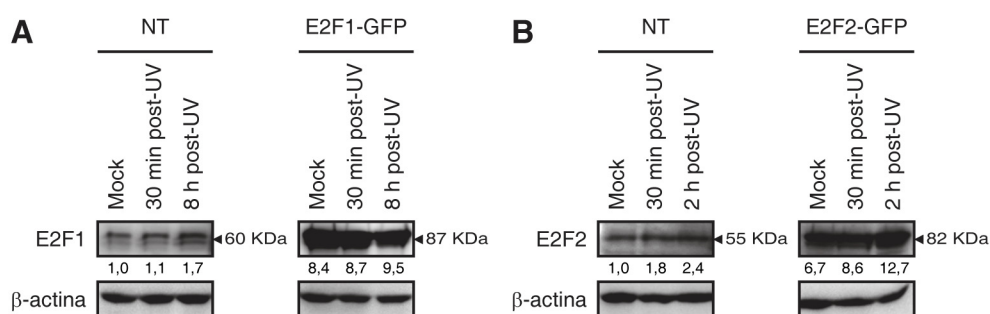
vacío, y fijadas 30 minutos post-irradiación UV para la inmunomarcación con un anticuerpo anti- $\gamma$ H2AX y observación por microscopía confocal (*Figura 21A*).



**Figura 21. La sobreexpresión de E2F1 y E2F2 reduce la intensidad de  $\gamma$ H2AX en respuesta a irradiación UV.** (A) Visualización de  $\gamma$ H2AX por microscopía confocal en células SH-SY5Y transfectadas con E2F1-GFP, E2F2-GFP o el vector pEGFP-C1 vacío, fijadas 30 minutos post-irradiación UV e incubadas con anticuerpo anti- $\gamma$ H2AX. Los núcleos fueron detectados mediante una tinción con DAPI. Escala, 10  $\mu$ m. (B-C) Cuantificación del porcentaje de células dañadas obtenida a partir de la determinación de la intensidad de  $\gamma$ H2AX. La misma fue llevada a cabo clasificando las células de acuerdo al nivel de expresión de E2F: sin E2F, E2F bajo o E2F alto en (B) o de acuerdo al nivel de expresión de GFP: sin GFP, GFP bajo o GFP alto en (C). Los resultados están expresados relativos a las células Mock-sin E2F en (B) o Mock-sin GFP en (C), las cuales representan el 10% de la máxima intensidad de  $\gamma$ H2AX observada; y, a su vez, el tratamiento con irradiación UV fue normalizado al tratamiento Mock para cada una de las intensidades de E2F (B) o GFP (C). Los datos representan la media $\pm$ S.E.M. de al menos cuatro ensayos independientes, en los que se analizaron entre 250 y 400 células para cada condición. Los valores P fueron obtenidos a partir de un análisis de ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey: \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; n.s. no significativo.

El análisis de datos se realizó clasificando las células según la intensidad de fluorescencia observada para E2F –sin E2F, E2F bajo o E2F alto–, lo cual es un reflejo de los niveles de expresión de la proteína. Se determinó una menor intensidad de

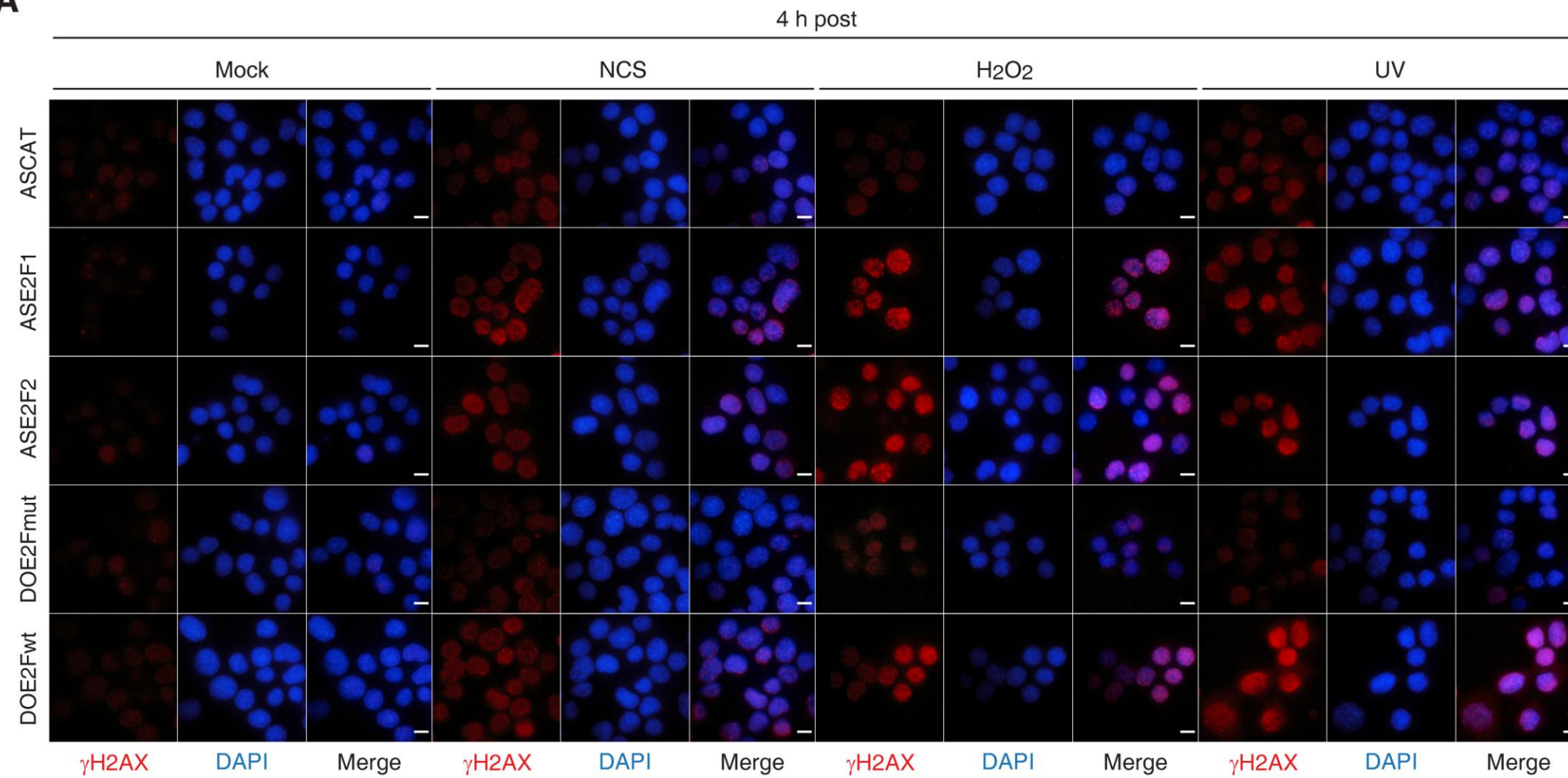
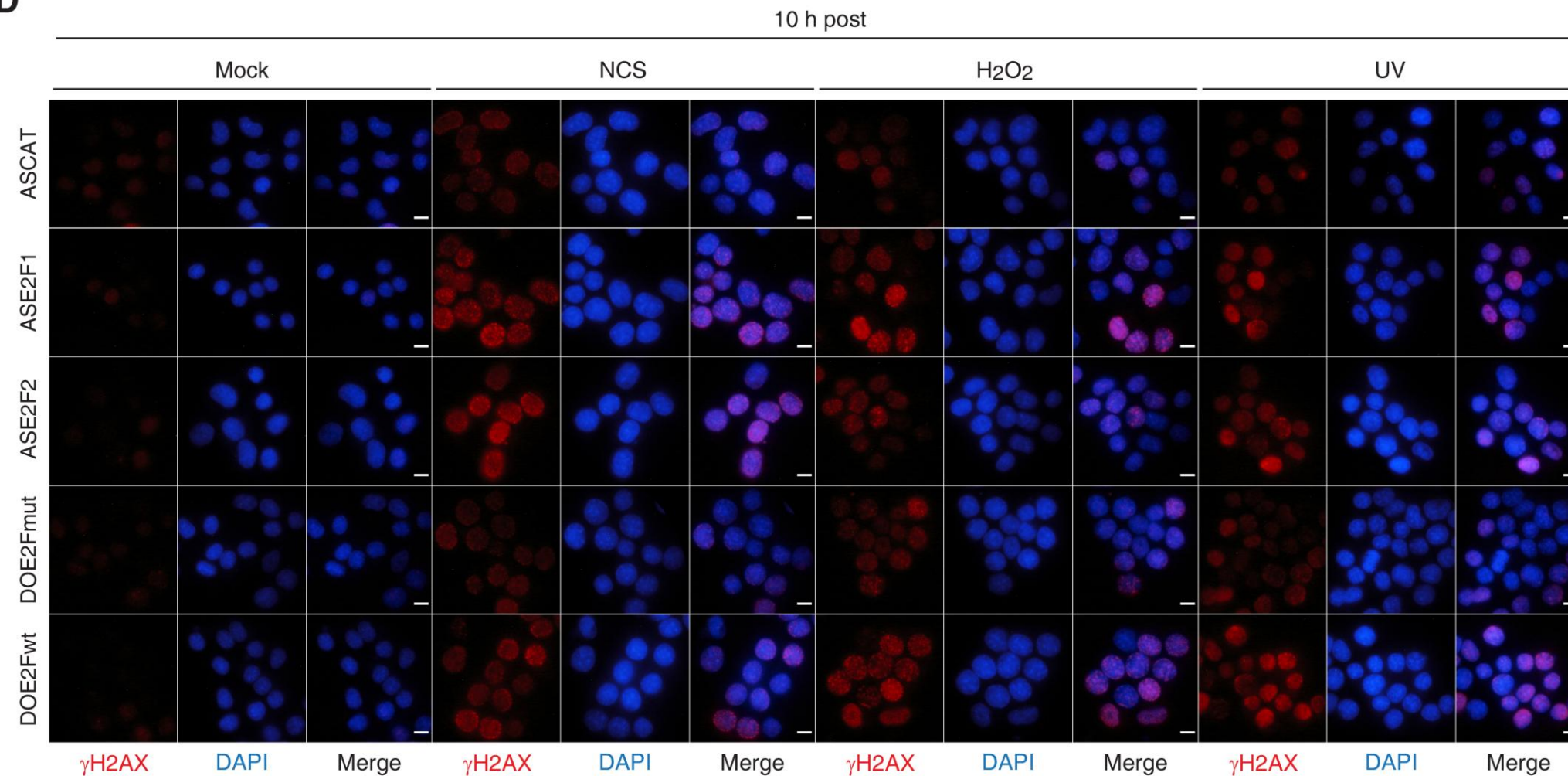
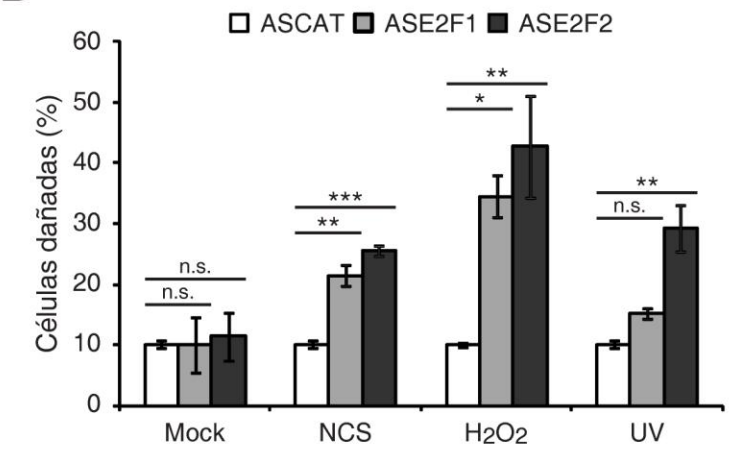
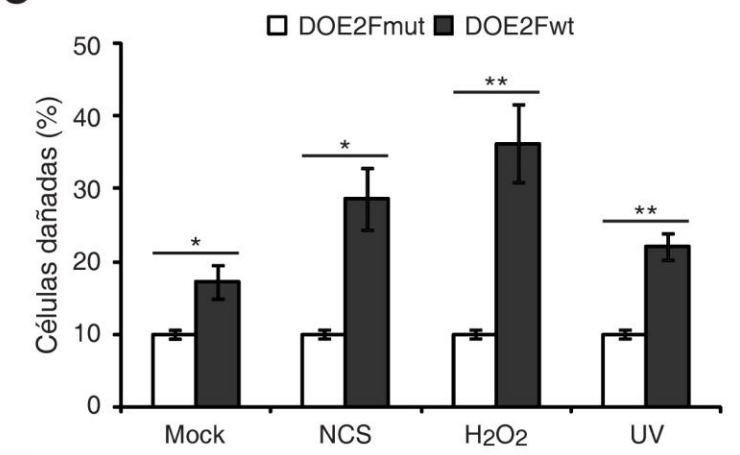
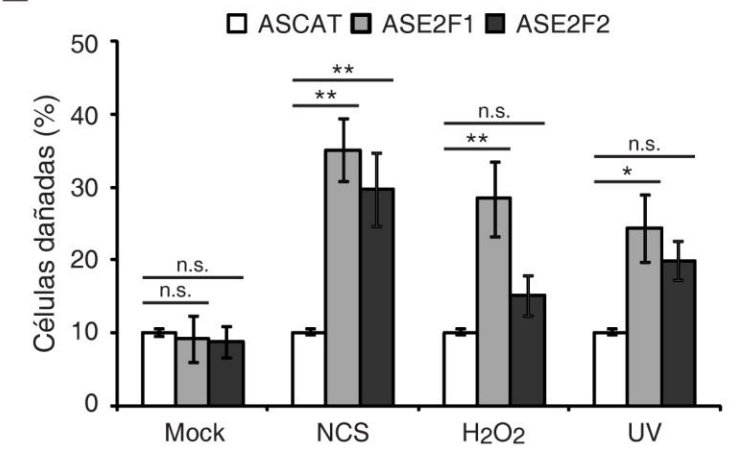
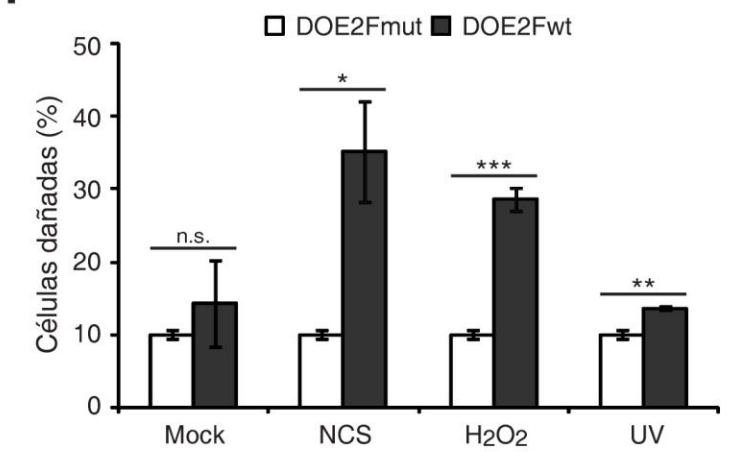
fluorescencia de  $\gamma$ H2AX post-irradiación UV en las células con sobreexpresión de E2F1 o E2F2 (Figura 21B). Más aún, fue sorprendente notar la correlación inversa entre el nivel de expresión de E2F1 y la intensidad detectada para  $\gamma$ H2AX. Por otro lado, no se observó una reducción en la intensidad de  $\gamma$ H2AX para los distintos niveles de expresión del vector GFP vacío –sin GFP, GFP bajo o GFP alto– (Figura 21C), indicando que la reducción previamente determinada es de hecho una consecuencia de la sobreexpresión de E2F1 y E2F2. Por último, cabe señalar que la sobreexpresión de E2F1 y E2F2 fue corroborada por medio de ensayos de Western Blot. Para ello, células SH-SY5Y no transfectadas o transfectadas con los vectores de expresión E2F1-GFP o E2F2-GFP fueron cosechadas 30 minutos post-UV –tiempo correspondiente a la fijación llevada a cabo para la cuantificación de la intensidad de  $\gamma$ H2AX por microscopía confocal–, o bien al tiempo de máximos niveles proteicos anteriormente observados para cada factor: 8 horas para E2F1 o 2 horas para E2F2. De esta manera, se determinó una inducción de 8,4 veces y 6,7 veces para E2F1 y E2F2 exógenos respectivamente, en comparación con las proteínas endógenas en condiciones basales (Figura 22). Dichos incrementos fueron mayores que los niveles detectados para las proteínas endógenas a los 30 minutos y a las 8 horas para E2F1 o 2 horas para E2F2 luego de la irradiación UV. A su vez, vale señalar que una vez más se comprobó la estabilización proteica de las proteínas exógenas al observar un aumento de sus niveles como consecuencia del daño al ADN. Por lo tanto, el conjunto de los resultados presentados sugieren un rol protector de E2F1 y E2F2 frente a la acumulación de daño al ADN en células neuronales expuestas a irradiación UV.



**Figura 22. La transfección con los vectores E2F1-GFP y E2F2-GFP conlleva a la sobreexpresión de dichas proteínas de fusión.** Western Blot para (A) E2F1 y (B) E2F2 en células SH-SY5Y transfectadas con los vectores E2F1-GFP o E2F2-GFP respectivamente, o no transfectadas (NT), y cosechadas a los tiempos post-irradiación UV indicados. Las bandas de E2F corresponden a la proteína endógena para la condición NT, y a la proteína exógena para la condición E2F-GFP. Se usó  $\beta$ -actina como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para E2F1 y E2F2 relativizada a la  $\beta$ -actina y a la condición NT-Mock.

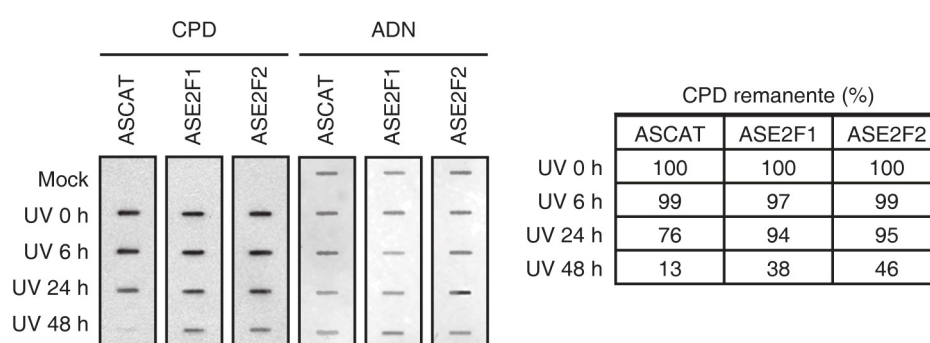
**Figura 23. El bloqueo de la inducción de E2F1 y E2F2 aumenta la intensidad de  $\gamma$ H2AX en respuesta al daño al ADN.** Visualización de  $\gamma$ H2AX por microscopía de fluorescencia en células Neuro-2a transfectadas con ASCAT, ASE2F1, ASE2F2, DOE2Fmut o DOE2Fwt, tratadas con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV, fijadas **(A-C)** 4 horas o **(D-F)** 10 horas post-tratamiento genotóxico e incubadas con anticuerpo anti- $\gamma$ H2AX. Los núcleos fueron detectados mediante una tinción con DAPI. Escala, 10  $\mu$ m. La cuantificación del porcentaje de células dañadas, obtenida a partir de la determinación de la intensidad de  $\gamma$ H2AX, se realizó expresando para cada tratamiento los valores de intensidad de  $\gamma$ H2AX relativos a las células transfectadas con ODN control: **(B,E)** ASCAT o **(C,F)** DOE2Fmut, las cuales representan el 10% de la máxima intensidad de  $\gamma$ H2AX observada. Los datos representan la media $\pm$ S.E.M. de al menos tres ensayos independientes, en los que se analizaron entre 300 y 1000 células para cada condición. Los valores P fueron obtenidos a partir de un análisis de ANOVA de un factor seguido por un test de Dunnett en **(B,E)**, o bien a partir de un test  $\tau$ -student en **(C,F)**: \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; n.s. no significativo.



**A****D****B****C****E****F**

A continuación, con el fin de discriminar las contribuciones de síntesis *de novo* de aquella de estabilización proteica a esta capacidad protectora de E2F1 y E2F2 frente al daño al ADN, se midió la intensidad de fluorescencia de  $\gamma$ H2AX por microscopía de fluorescencia en células Neuro-2a transfectadas con los ODNs antisentido o *decoy* y cosechadas luego del tratamiento genotóxico (Figura 23A,D). Dicho análisis se realizó a las 4 o 10 horas luego del daño al ADN, y en ambos puntos temporales se detectó un aumento en el porcentaje de células dañadas en presencia de ASE2F1 y ASE2F2 (Figura 23B,E) y de DOE2Fwt (Figura 23C,F) para todos los agentes genotóxicos utilizados. Cabe señalar que el análisis temporal con los ODNs antisentido nos permitió determinar que los incrementos de los ARNm de E2F1 y E2F2 ejercen su acción protectora frente al daño al ADN en células neuronales a diferentes tiempos post-daño: E2F2 en una etapa temprana y E2F1 en una etapa tardía en respuesta a la injuria genotóxica. En resumen, estos resultados sugieren que la inducción de E2F1 y E2F2 como consecuencia del tratamiento genotóxico, proveniente de la síntesis *de novo* o bien de la estabilización proteica, reduce la acumulación de daño al ADN.

Finalmente, con el objetivo de determinar si E2F1 y E2F2 afectan la capacidad de reparación NER-GGR, se midieron los niveles de los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) inducidos por irradiación UV en ADN total extraído de células SH-SY5Y transfectadas con los ODNs antisentido y cosechadas a distintos tiempos luego de la exposición a luz UV. Se observó un retraso en la tasa de remoción de los CPDs en células tratadas con ASE2F1 y ASE2F2 (Figura 24).



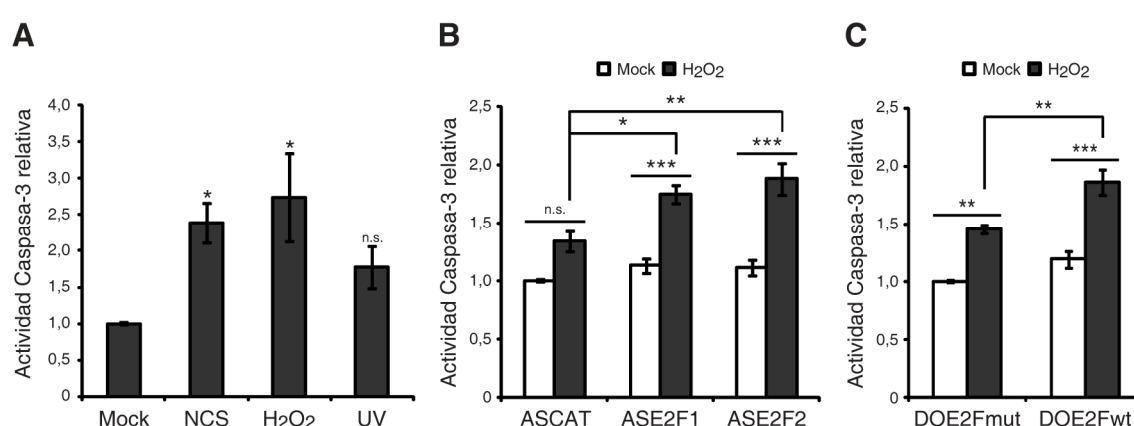
**Figura 24. E2F1 y E2F2 contribuyen a una eliminación más eficiente de las lesiones CPD.** Ensayo de reparación del ADN - Slot Blot en células SH-SY5Y transfectadas con ASCAT, ASE2F1 o ASE2F2, sometidas a irradiación UV y cosechadas inmediatamente (0 h) o 6, 24 o 48 horas post-irradiación. Masas equivalentes de ADN genómico fueron sembradas en una membrana de nylon, y la presencia de fotoproductos CPD fue evaluada mediante Western Blot. Una tinción con azul de metileno para detectar ADN total se usó como control de carga. La tabla indica el promedio de dos ensayos independientes del porcentaje de lesiones CPD remanentes, calculado a partir de la cuantificación para CPD relativizada al ADN total.



Mientras que las lesiones CPD comenzaron su remoción a las 24 horas post-UV y fueron casi totalmente reparadas a las 48 horas post-UV en células control transfectadas con ASCAT, niveles significativos de dichas lesiones fueron aún detectados en el último punto temporal analizado en células transfectadas con ASE2F1 y ASE2F2. Estos resultados indican que E2F1 y E2F2 promueven una eficiente remoción de las lesiones CPD en el ADN luego de la irradiación UV.

## 7. La inducción de E2F1 y E2F2 reduce la respuesta apoptótica como consecuencia del daño al ADN

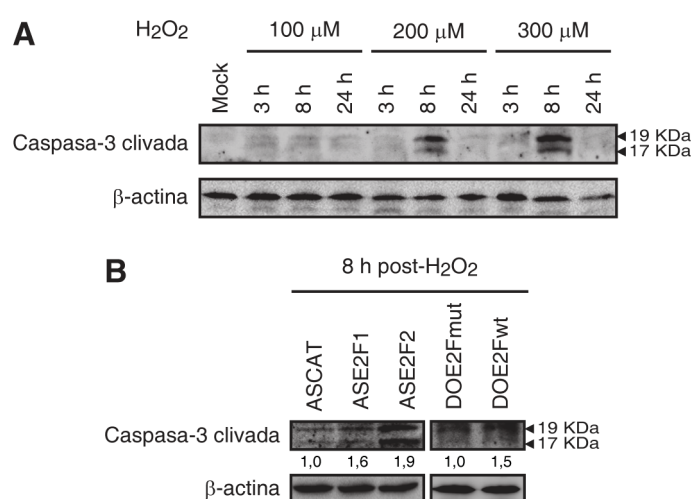
El gatillado de muerte celular programada o apoptosis es una consecuencia común de la excesiva acumulación de daño al ADN. Con el fin de examinar si la inducción de E2F1 y E2F2 afecta la respuesta apoptótica luego de estrés genotóxico, se determinó la actividad de caspasa-3 en células SH-SY5Y sometidas al tratamiento con cualquiera de los tres agentes genotóxicos. La enzima caspasa-3 es una proteasa crucial en la vía apoptótica. La misma es sintetizada como zimógeno inactivo (pro-caspasa), y su activación proteolítica conlleva al clivaje de diversas proteínas celulares claves en la muerte celular programada (Porter and Janicke 1999). Se observó que los tratamientos con NCS y  $H_2O_2$  condujeron a un incremento significativo en la actividad de caspasa-3 (Figura 25A).



**Figura 25. E2F1 y E2F2 reducen la actividad de caspasa-3 en respuesta a estrés genotóxico.** (A) Actividad de caspasa-3 de células SH-SY5Y cosechadas 24 horas post-tratamiento con NCS,  $H_2O_2$  o UV. (B-C) Actividad de caspasa-3 de células SH-SY5Y transfectadas con (B) ASCAT, ASE2F1 o ASE2F2, o (C) DOE2Fmut o DOE2Fwt, y cosechadas 24 horas luego del tratamiento con  $H_2O_2$ . En (A) los resultados están expresados relativos a las células Mock, y en (B,C) relativos a las células Mock transfectadas con ODN control: (B) ASCAT o (C) DOE2Fmut. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. de cuatro ensayos independientes realizados por duplicado. Los valores P fueron obtenidos a partir de un análisis de ANOVA de un factor seguido por un test de Dunnett en (A) o de Tukey en (B,C): \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; n.s. no significativo.

A continuación, se midió la actividad de caspasa-3 en células SH-SY5Y transfectadas con los ODNs antisentido o *decoy* e incubadas con  $H_2O_2$ , es decir, aquel agente que había gatillado la máxima actividad. Se detectaron mayores niveles de actividad de caspasa-3 en presencia de ASE2F1 y ASE2F2 (Figura 25B), y de DOE2Fwt (Figura 25C) luego de la exposición a  $H_2O_2$ , sugiriendo que la inducción de E2F1 y E2F2 luego de estrés genotóxico disminuye la actividad enzimática de caspasa-3.

Para corroborar los resultados obtenidos, se analizó el clivaje de caspasa-3 mediante ensayos de Western Blot en células SH-SY5Y sometidas al tratamiento con  $H_2O_2$ . En primer lugar se estableció la dosis genotóxica y el tiempo de cosecha óptimos, llevando a cabo una curva de dosis de 100  $\mu M$ , 200  $\mu M$  y 300  $\mu M$  de  $H_2O_2$  y cosechando las células 3, 8 o 24 horas post-daño. Se determinó que la detección de caspasa-3 clivada es óptima a las 8 horas luego del tratamiento con  $H_2O_2$  200  $\mu M$  (Figura 26A).



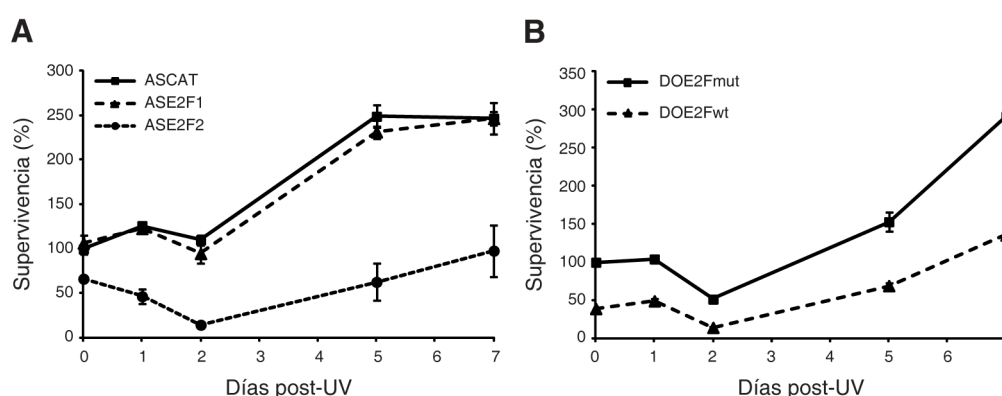
**Figura 26. E2F1 y E2F2 reducen la activación de caspasa-3 por estrés oxidativo.** (A) Western Blot para caspasa-3 clivada en células SH-SY5Y sometidas a una curva de dosis-tiempo con  $H_2O_2$ . (B) Western Blot para caspasa-3 clivada en células SH-SY5Y transfectadas con ASCAT, ASE2F1, ASE2F2, DOE2Fmut o DOE2Fwt, tratadas con  $H_2O_2$  200  $\mu M$  y cosechadas 8 horas después. En todos los casos se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. Se muestran los fragmentos de 17 y 19 KDa correspondientes a la caspasa-3 activada producto del clivaje cercano a Asp175. Los números debajo de las bandas en (B) indican la cuantificación para caspasa-3 clivada relativizada a la  $\beta$ -actina y a la condición ASCAT o DOE2Fmut.

Sabiendo esto, se realizó un ensayo de Western Blot para caspasa-3 clivada en células SH-SY5Y transfectadas con los ODNs antisentido o *decoy* e incubadas con  $H_2O_2$  por el tiempo y dosis óptimos establecidos previamente. Se observó que la presencia ODNs ASE2F1, ASE2F2 y DOE2Fwt produjo un aumento en el clivaje de la enzima caspasa-3 (Figura 26B), indicando que el bloqueo de la inducción de E2F1 y E2F2 en respuesta al

daño al ADN gatilla la activación de caspasa-3. En conjunto, los resultados presentados sugieren un rol protector de E2F1 y E2F2 frente a la apoptosis inducida por injuria genotóxica en células neuronales.

#### 8. E2F1 y E2F2 inducidos por daño al ADN confieren una incrementada resistencia celular a agentes genotóxicos

Los resultados obtenidos previamente, los cuales involucran a E2F1 y E2F2 en la reducción de la respuesta apoptótica y en la protección de las células neuronales frente a la acumulación de lesiones en el ADN luego de estrés genotóxico, sugieren que el bloqueo de la inducción de dichos factores E2F también debería afectar la viabilidad celular en respuesta al daño al ADN. Con el fin de probar la hipótesis planteada, se determinó la supervivencia celular mediante ensayos de MTT en células SH-SY5Y transfectadas con los ODNs antisentido o *decoy*, analizadas a distintos tiempos durante los 7 días posteriores a la irradiación UV. Se observó una disminución en la supervivencia celular en las células que fueron transfectadas con ASE2F2 o DOE2Fwt, pero no en aquellas en presencia de ASE2F1 (Figura 27).

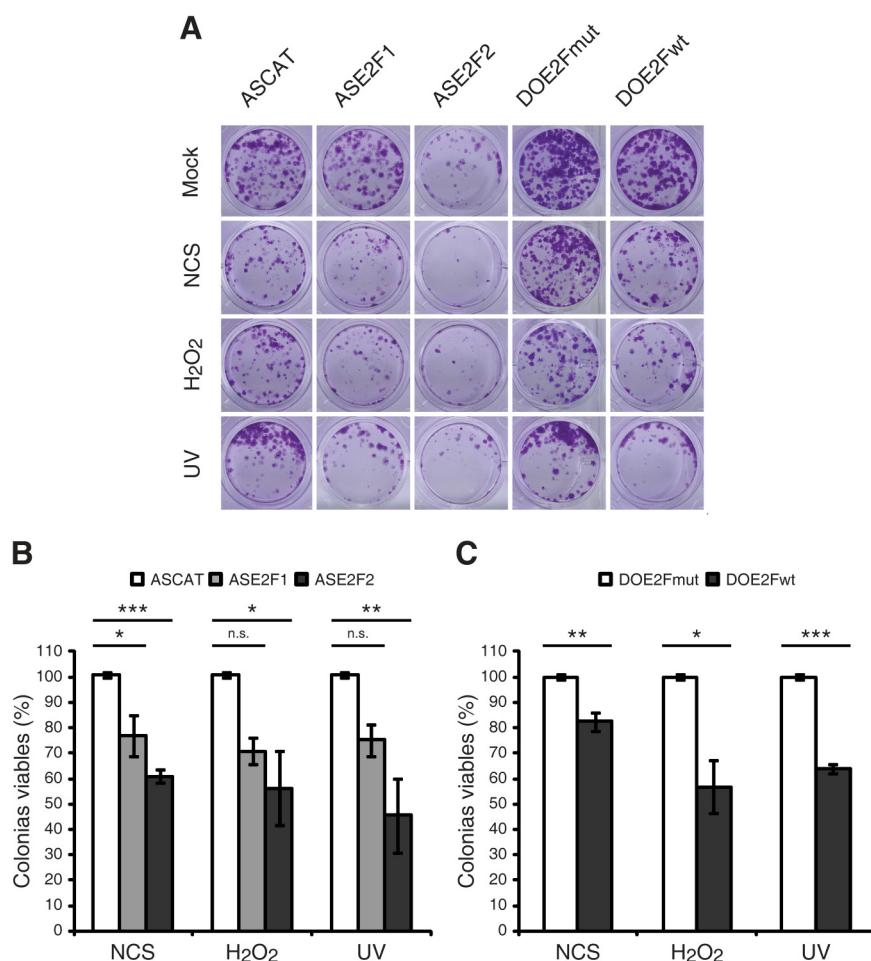


**Figura 27. E2F1 y E2F2 afectan la supervivencia celular en respuesta a irradiación UV.** Ensayo de MTT en células SH-SY5Y transfectadas con (A) ASCAT, ASE2F1 o ASE2F2, o (B) DOE2Fmut o DOE2Fwt, y sometidas a irradiación UV. La cuantificación de las células viables se realizó midiendo la absorbancia a 570 nm, relativizando los datos al día 0 del ODN control correspondiente: (A) ASCAT o (B) DOE2Fmut. Los datos representan la media  $\pm$  S.D. de un experimento representativo de cuatro ensayos independientes realizados por octuplicado.

Para continuar con el análisis de los efectos a largo plazo y la relevancia biológica en la viabilidad celular de E2F1 y E2F2, se realizaron ensayos clonogénicos. Para ello, células SH-SY5Y sembradas de forma diluída fueron transfectadas con ASE2F1, ASE2F2 o DOE2Fwt, sometidas al tratamiento con cualquiera de los tres agentes genotóxicos, y evaluadas 10 días después en relación a su capacidad formadora de colonias (Figura



28A). La presencia de los ODNs antisentido o *decoy* redujo el porcentaje de colonias formadas luego de la exposición a cualquiera de los genotóxicos (Figura 28B,C). En conclusión, el conjunto de los resultados presentados demuestran un rol para E2F2, y en menor medida para E2F1, en la resistencia celular a diversos agentes genotóxicos.



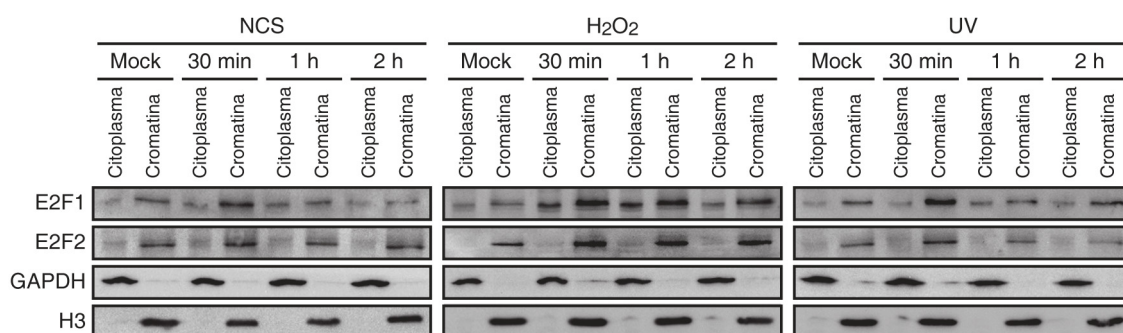
**Figura 28. E2F1 y E2F2 afectan la viabilidad celular en respuesta a estrés genotóxico.** (A) Ensayo clonogénico en células SH-SY5Y transfectadas con ASCAT, ASE2F1, ASE2F2, DOE2Fmut o DOE2Fwt, y tratadas con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV. Se muestran las colonias visualizadas 10 días después del estímulo genotóxico. (B-C) Cuantificación de las colonias para (B) ASCAT, ASE2F1 o ASE2F2, o (C) DOE2Fmut o DOE2Fwt para cada tratamiento. Los resultados están expresados relativos a las células Mock para cada ODN. Los datos representan la media±S.E.M. de cuatro ensayos independientes realizados por cuadruplicado. Los valores P fueron obtenidos a partir de un análisis de ANOVA de un factor seguido por un test de Dunnett en (B), o bien a partir de un test  $t$ -student en (C): \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; n.s. no significativo.

## 9. E2F1 y E2F2 se acumulan en sitios de lesión al ADN

Con el objetivo de determinar el mecanismo de acción de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN, se investigó el rol no-transcripcional de dichos factores y su potencial localización en sitios de lesión al ADN en células neuronales. Como fue mencionado

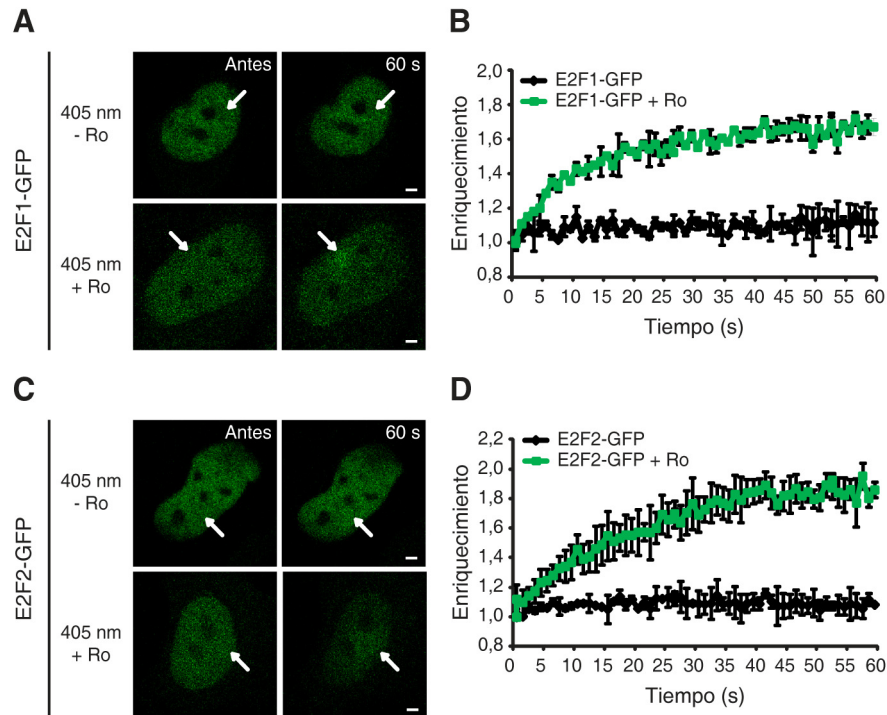
anteriormente (ver *Introducción*), E2F1 es reclutado a sitios de lesión por irradiación UV y también a regiones de DSBs en el ADN. Allí, lleva a cabo un rol no-transcripcional que contribuye al mantenimiento de la integridad del genoma ya que favorece una conformación laxa de la cromatina y promueve el reclutamiento de factores de la maquinaria de reparación (Guo, Chen et al. 2010; Chen, Zhu et al. 2011; Guo, Chen et al. 2011).

En primer lugar, se estudió el reclutamiento de E2F1 y E2F2 a la cromatina como consecuencia del estrés genotóxico. Para ello, las fracciones citoplasmática y cromatínica de células SH-SY5Y sometidas a un fraccionamiento subcelular luego del tratamiento con cualquiera de los tres agentes genotóxicos, fueron analizadas mediante ensayos de Western Blot para E2F1 y E2F2. Se observó un aumento de las proteínas E2F1 y E2F2 en la fracción cromatínica insoluble luego de la exposición a los genotóxicos, principalmente a los 30 minutos post-daño (*Figura 29*).



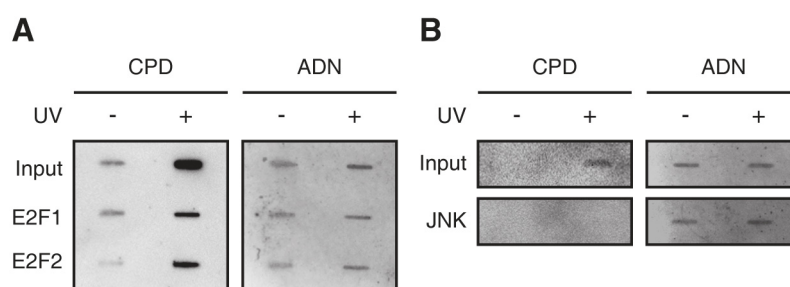
**Figura 29. Aumento de la asociación de E2F1 y E2F2 a la cromatina luego de estrés genotóxico.** Western Blot para E2F1 y E2F2 de las fracciones subcelulares citoplasmática y cromatínica de células SH-SY5Y sometidas al tratamiento con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV, y cosechadas a los tiempos indicados. La proteína GAPDH se utilizó como marcador de citoplasma e H3 como marcador de cromatina.

A continuación, con el fin de determinar si E2F1 y E2F2 se acumulan en sitios de lesión al ADN, se llevaron a cabo experimentos de microirradiación con un láser a 405 nm en presencia o no del fotosensibilizador Ro 19-8022, el cual promueve la formación de daño oxidativo localizado en el ADN (Will, Gocke et al. 1999), en células SH-SY5Y previamente transfectadas con los vectores E2F1-GFP o E2F2-GFP. Se observó el reclutamiento de E2F1 y E2F2 a sitios de lesión al ADN, pero solamente en presencia de Ro 19-8022 (*Figura 30; Videos 1,2*).



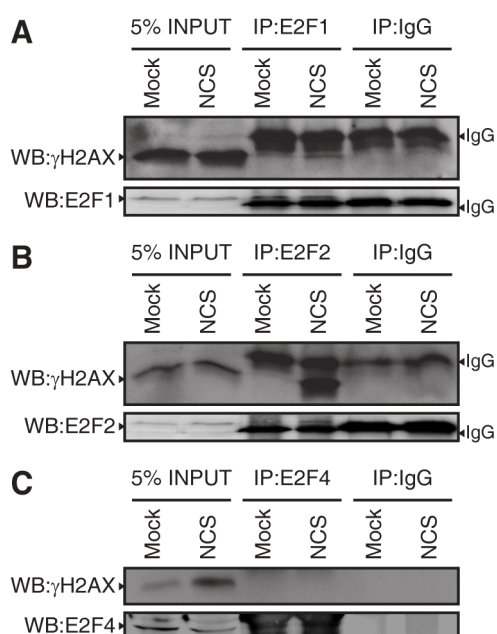
**Figura 30. E2F1 y E2F2 son reclutados a lesiones al ADN por daño oxidativo.** Ensayos de *live-cell imaging* en células SH-SY5Y transfectadas con (A-B) E2F1-GFP o (C-D) E2F2-GFP, sometidas a microirradiación a 405 nm con un láser al 10% de potencia durante ~6 segundos en una región de 1  $\mu\text{m}^2$ , habiendo sido pre-incubadas o no con el fotosensibilizador Ro 19-8022 (Ro). (A,C) Imágenes obtenidas antes o 60 segundos después de la microirradiación en ausencia o presencia del fotosensibilizador Ro. Las flechas indican el sitio de microirradiación. Escala, 2  $\mu\text{m}$ . (B,D) Cinéticas de reclutamiento de (B) E2F1-GFP y (D) E2F2-GFP obtenidas según las intensidades de fluorescencia de la zona irradiada medidas durante el minuto de análisis y normalizadas al valor inmediato post-irradiación. Los datos representan la media  $\pm$  S.D. de dos ensayos independientes, en los que se analizaron 10 células para cada condición.

Estos resultados sugieren que ambos factores se localizan en bases oxidadas del ADN, pero no en regiones de SSBs generadas por el láser a 405 nm. A continuación, con el objetivo de determinar si E2F1 y E2F2 son reclutados a sitios de lesión al ADN generados por irradiación UV, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de Slot Blot a partir de células SH-SY5Y transfectadas con los plásmidos de expresión E2F1-HA o E2F2-HA cosechadas 30 minutos luego de la exposición a luz UV. Se determinó la unión de E2F1 y E2F2 a fragmentos de ADN con lesiones CPD, características de daño al ADN por irradiación UV (Figura 31). JNK fue empleada como control negativo de inmunoprecipitación. Por lo tanto, los resultados presentados demuestran la acumulación de E2F1 y E2F2 en sitios de lesión al ADN de tipo oxidativo o por luz UV.



**Figura 31. E2F1 y E2F2 son reclutados a lesiones al ADN inducidas por luz UV.** Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina - Slot Blot en células SH-SY5Y transfectadas con **(A)** E2F1-HA o E2F2-HA, o **(B)** JNK-HA, y sometidas a *cross-linking* 30 minutos post-irradiación UV, lisis, sonicación e inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-HA. Masas equivalentes de ADN genómico fueron sembradas con un aparato de Slot Blot en una membrana de nylon, y la presencia de fotoproductos CPD fue evaluada mediante Western Blot. Una tinción con azul de metileno para detectar ADN total fue utilizada como control de carga.

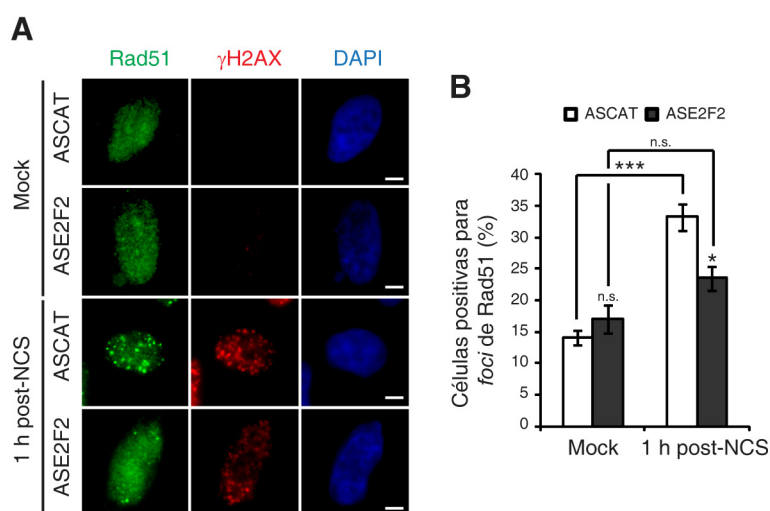
Por último, con el fin de estudiar si E2F1 y E2F2 interaccionan con factores de la maquinaria de señalización de daño al ADN, entre ellos,  $\gamma$ H2AX, se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación. Para ello, extractos totales de células SH-SY5Y cosechadas 1 hora post-tratamiento con NCS fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-E2F1 o anti-E2F2 y analizados mediante Western Blot para  $\gamma$ H2AX. Se observó que  $\gamma$ H2AX co-inmunoprecipita con los factores E2F1 y E2F2 (*Figura 32A,B*). El miembro de la familia E2F4 fue utilizado como control negativo de inmunoprecipitación dado que no se asoció a  $\gamma$ H2AX en respuesta al daño al ADN inducido por NCS (*Figura 32C*). De esta manera, los resultados indican una interacción E2F1- $\gamma$ H2AX y E2F2- $\gamma$ H2AX luego de estrés genotóxico.



**Figura 32. E2F1 y E2F2 se asocian a  $\gamma$ H2AX en respuesta al daño al ADN.** Ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos celulares totales de células SH-SY5Y cosechadas 1 hora post-NCS. La inmunoprecipitación (IP) fue realizada con anticuerpos **(A)** anti-E2F1, **(B)** anti-E2F2 o **(C)** anti-E2F4. Las proteínas asociadas fueron detectadas por Western Blot (WB). El anticuerpo IgG no específico fue utilizado como control de IP.

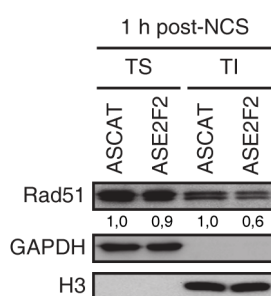
## 10. E2F2 promueve la formación de *foci* de Rad51 e induce la acetilación de histonas en respuesta al daño al ADN

El rol de E2F1 en los sitios de lesión al ADN ha sido caracterizado en trabajos previos. Luego de estrés genotóxico, E2F1 se localiza en sitios de daño al ADN y promueve el reclutamiento de factores de reparación del ADN y enzimas modificadoras de la cromatina (Liu, Lin et al. 2003; Chen, Zhu et al. 2011; Guo, Chen et al. 2011). Con el fin de estudiar las funciones no-transcripcionales de E2F2 en los sitios de lesión al ADN, se estudió en primer lugar si, al igual que fue descripto para E2F1 (Chen, Zhu et al. 2011), dicho factor es capaz de reclutar al factor de reparación Rad51 en regiones de DSBs en el ADN. Rad51 es la principal recombinasa en la vía de reparación el ADN por HR (Krejci, Altmannova et al. 2012). De esta manera, células SH-SY5Y transfectadas con el ODN antisentido de E2F2 y fijadas 1 hora luego del tratamiento con NCS para la inmunomarcación con un anticuerpo anti-Rad51, fueron analizadas por medio de microscopía de fluorescencia (Figura 33A). Se determinó una reducida formación de *foci* de Rad51 en presencia de ASE2F2 en respuesta al daño al ADN inducido por NCS (Figura 33B).



**Figura 33. E2F2 promueve la formación de *foci* de Rad51 en respuesta al daño por NCS.** (A) Visualización de Rad51 y  $\gamma$ H2AX por microscopía de fluorescencia en células SH-SY5Y transfectadas con ASCAT o ASE2F2, fijadas 1 hora post-tratamiento con NCS, e incubadas con anticuerpos anti-Rad51 y anti- $\gamma$ H2AX. Los núcleos fueron detectados mediante una tinción con DAPI. Escala, 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación del porcentaje de células positivas para *foci* de Rad51. Se consideró como positivas aquellas células con al menos cinco *foci* de Rad51. Los datos representan la media $\pm$ S.E.M. de cuatro ensayos independientes, en los que se analizaron entre 100 y 250 células para cada condición. Los valores P fueron obtenidos a partir de un análisis de ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey: \*P<0,05; \*\*\*P<0,001; n.s. no significativo.

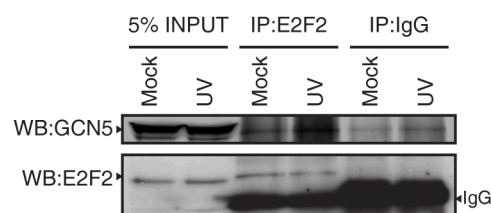
Para confirmar dicho resultado, se llevó a cabo la detección de la redistribución de Rad51 a los sitios de lesión al ADN por medio de un fraccionamiento subcelular con Tritón X-100 (Mladenov, Anachkova et al. 2006). Para ello, células SH-SY5Y transfectadas con ASE2F2 y cosechadas 1 hora luego del tratamiento con NCS fueron fraccionadas en fracciones solubles e insolubles en Tritón X-100, las cuales contienen proteínas solubles citoplasmáticas o bien proteínas unidas a la cromatina respectivamente. Dichas fracciones fueron analizadas mediante ensayos de Western Blot para Rad51. Se observó un menor reclutamiento de Rad51 a la cromatina en la fracción insoluble en Tritón X-100 luego del tratamiento con NCS en células transfectadas con ASE2F2 (*Figura 34*). En conjunto, los resultados presentados indican que E2F2, tal como fue reportado en trabajos previos para E2F1, está también implicado en el mantenimiento de la estabilidad genómica por medio del reclutamiento de factores de reparación del ADN a sitios de DSBs en el ADN.



**Figura 34. E2F2 promueve la asociación de Rad51 a la cromatina.** Western Blot para Rad51 de las fracciones solubles (TS) o insolubles (TI) en Tritón X-100 de células SH-SY5Y transfectadas con ASCAT o ASE2F2, y cosechadas 1 hora post-tratamiento con NCS. La proteína GAPDH se utilizó como marcador de la fracción TS citoplasmática e H3 como marcador de la fracción TI cromatínica. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para Rad51 relativizada a GAPDH o H3 para las fracciones TS o TI respectivamente, y a la condición ASCAT para cada fracción.

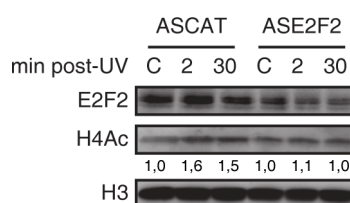
Por otro lado, se ha descrito que E2F1 interactúa con la acetiltransferasa de histonas GCN5, promoviendo su reclutamiento a sitios de lesión al ADN, y que tanto E2F1 como GCN5 son necesarias para la inducción de la acetilación de H3 en Lys9 en respuesta a la irradiación UV (Guo, Chen et al. 2011). De modo de evaluar si E2F2 está implicado en un mecanismo epigenético similar, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en células SH-SY5Y cosechadas 30 minutos post-UV con el fin de determinar si E2F2 también se asocia a GCN5 luego de la exposición a luz UV. Los resultados demostraron una interacción entre E2F2 y GCN5 en respuesta a la irradiación UV (*Figura 35*).





**Figura 35. E2F2 se asocia a GCN5 en respuesta a irradiación UV.** Ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos celulares totales de células SH-SY5Y cosechadas 30 minutos post-irradiación UV. La inmunoprecipitación (IP) fue llevada a cabo con anticuerpo anti-E2F2 y las proteínas asociadas fueron detectadas por Western Blot (WB). El anticuerpo IgG no específico fue utilizado como control de IP.

La acetiltransferasa GNC5 ha sido involucrada en la acetilación de las histonas H3 y H4 luego del daño al ADN por luz UV (Brand, Moggs et al. 2001). Con el objetivo de determinar si el bloqueo de la inducción de E2F2 afecta la acetilación global de la histona H4 luego de irradiación UV, se analizaron los niveles de H4 acetilada por medio de ensayos de Western Blot en células SH-SY5Y transfectadas con ASE2F2 y cosechadas 2 o 30 minutos post-UV. Se determinó que el bloqueo de la inducción de E2F2 previno la inducción de la acetilación de la histona H4 por exposición a luz UV (Figura 36). Por lo tanto, los resultados sugieren que E2F2, tal como fue reportado previamente para E2F1, está implicado en un mecanismo epigenético que promueve la acetilación de histonas en respuesta al daño al ADN y, por ende, facilitaría la reparación del ADN al incrementar la accesibilidad de la maquinaria de reparación del ADN a sitios de daño.



**Figura 36. E2F2 promueve la acetilación de la histona H4 luego de exposición a luz UV.** Western Blot para E2F2 e H4 acetilada (H4Ac) de células SH-SY5Y transfectadas con ASCAT o ASE2F2, y cosechadas a los tiempos indicados post-irradiación UV. Se usó H3 como control de carga. Los números debajo de las bandas indican la cuantificación para H4Ac relativizada a H3 y a la condición ASCAT-control. C, células control.

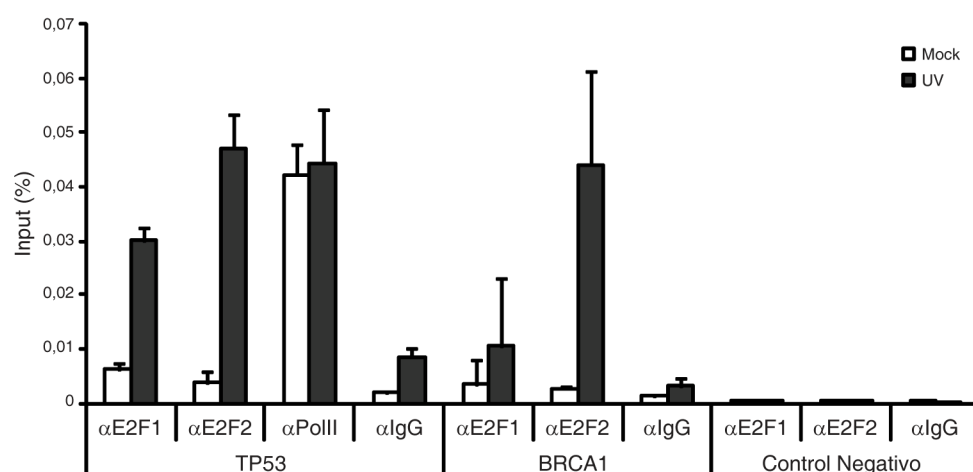
## 11. E2F1 y E2F2 se asocian a los promotores de *TP53* y *BRCA1* e inducen su transcripción luego de irradiación UV

Para continuar con el estudio del mecanismo de acción de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN y el potencial rol transcripcional de dichos factores, se realizaron ensayos

de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) seguidos de PCR cuantitativa (qPCR) del ADN precipitado. Dado que en resultados previos se demostró que ambos factores son activos en sus funciones reguladoras de la transcripción, y que disminuyen la acumulación del daño al ADN promoviendo la supervivencia celular luego de estrés genotóxico, se estudió la potencial asociación de E2F1 y E2F2 a los promotores de genes relacionados con la respuesta al daño al ADN. Aquellos genes seleccionados fueron *TP53* y *BRCA1*, los cuales son genes supresores tumorales que contienen sitios consenso de unión para E2F en sus promotores. p53 es un factor de transcripción conocido como el “guardián del genoma”, el cual sufre modificaciones post-traduccionales luego de injuria genotóxica que conllevan a su estabilización y activación. Una vez activo, dependiendo del tipo celular y de la severidad de la lesión al ADN, p53 puede dirigir la respuesta celular hacia la detención del ciclo celular, activación de enzimas involucradas en la reparación del ADN, senescencia o apoptosis (Kruse and Gu 2009). BRCA1 es una proteína clave en la vía de señalización DDR. Luego de ser fosforilada por ATM, BRCA1 se acumula en sitios de lesión al ADN donde –según con qué proteínas se asocie– participa, por un lado, en la activación de los puntos de control del ciclo celular G1/S, S o G2/M y, por otro lado, en la reparación del ADN por HR o NHEJ (Wu, Lu et al. 2010). Tanto p53 como BRCA1 han sido descritos como factores neuroprotectores. Trabajos han demostrado que al alcanzarse niveles crónicos de toxicidad neuronal y una alterada homeóstasis celular, p53 sufre cambios conformacionales que conducen a la transactivación de genes blanco no-canónicos y al consecuente desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Lanni, Racchi et al. 2012). Si bien p53 ha sido comúnmente relacionado con la inducción de apoptosis en procesos neurodegenerativos, se han encontrado excepciones donde participaría en la promoción de la supervivencia celular (Raina, Hochman et al. 2001; Tedeschi and Di Giovanni 2009). En relación a BRCA1, esta se localiza en los ovillos neurofibrilares característicos de la enfermedad de Alzheimer, donde media la activación de los puntos de control del ciclo celular y la reparación del ADN dañado (Evans, Raina et al. 2007). Además, se ha observado una aumentada fosforilación de BRCA1 como consecuencia del daño al ADN en la enfermedad de Huntington. Dicha desregulación afecta la dinámica espacio-temporal de reclutamiento de  $\gamma$ H2AX por BRCA1 a los sitios de lesión al ADN y, en consecuencia, contribuye a la neurodegeneración por una demorada activación de la vía DDR (Jeon, Kim et al. 2012).



Ensayos de ChIP-qPCR con anticuerpos específicos a partir de extractos de células SH-SY5Y sometidas a *cross-linking* 30 minutos luego de exposición a luz UV, demostraron un enriquecimiento de los factores E2F1 y E2F2 en el promotor de *TP53* y un enriquecimiento de E2F2 en el promotor de *BRCA1*. En relación al factor E2F1, se observó una tendencia a su reclutamiento al promotor de *BRCA1* en respuesta a irradiación UV (Figura 37).

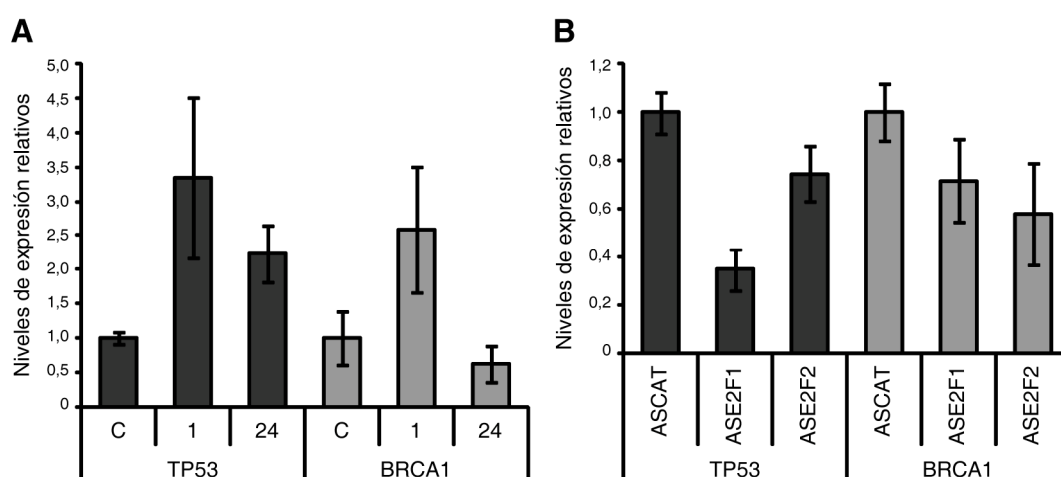


**Figura 37. E2F1 y E2F2 aumentan su asociación a los promotores de *TP53* y *BRCA1* en respuesta a irradiación UV.** Ensayos de ChIP a partir de lisados de células SH-SY5Y sometidas a *cross-linking* 30 minutos post-irradiación UV y a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-E2F1 o anti-E2F2. Los anticuerpos anti-PolII e IgG no específico se utilizaron como anticuerpos positivo o negativo de inmunoprecipitación respectivamente. El ADN inmunoprecipitado se analizó mediante qPCR con *primers* específicos para los promotores de *TP53* y *BRCA1*. Para control negativo de qPCR se amplificó una región del genoma en la cual se sabe no hay pegada de factores de transcripción. Los datos están expresados como porcentaje del input, y corresponden a un experimento representativo. Los errores fueron obtenidos por propagación del error.

Cabe señalar que como control negativo de inmunoprecipitación se empleó un anticuerpo IgG monoclonal de ratón, mientras que como control positivo se utilizó un anticuerpo anti-ARN Polimerasa II, proteína que se encuentra pegada abundantemente en promotores activos transcripcionalmente, como ser *TP53* (Massip, Arcondeguy et al. 2013). Por otro lado, como control negativo de amplificación por qPCR se determinó la pegada de E2F1 y E2F2 en una región del genoma que flanquea los genes *GAPDH* y *CNAP1*, en la cual se sabe no hay unión de factores de transcripción al ADN, a la que se denominó “control negativo”.

A continuación, se evaluó si el enriquecimiento observado de E2F1 y E2F2 en los promotores de *TP53* y *BRCA1* afecta la expresión de dichos genes. En primer lugar se analizó la expresión de tales genes por medio de ensayos de RT-qPCR a partir de

células SH-SY5Y cosechadas 1 o 24 horas luego de la exposición a luz UV. Se determinó un máximo en los niveles de transcripto transcurrida 1 hora post-irradiación UV (Figura 38A). De esta manera, con el fin de determinar si la inducción de E2F1 y E2F2 afectan el incremento en la expresión de *TP53* y *BRCA1* por irradiación UV, se midieron los niveles de ARNm de dichos genes por RT-qPCR en células SH-SY5Y transfectadas con ASE2F1 o ASE2F2 y cosechadas 1 hora post-UV, es decir, en aquel punto con máximos niveles de transcripto de *TP53* y *BRCA1*. El bloqueo de la inducción de E2F1 y E2F2 por los ODNs antisentido previno el aumento de la expresión de *TP53* y *BRCA1* en respuesta al daño al ADN inducido por luz UV (Figura 38B).



**Figura 38. E2F1 y E2F2 promueven la expresión de *TP53* y *BRCA1* luego de exposición a luz UV.** (A) Análisis de los niveles de ARNm de *TP53* y *BRCA1* mediante ensayos de RT-qPCR en células SH-SY5Y cosechadas 1 o 24 horas post-irradiación UV. Los datos representan la media $\pm$ S.E.M. de tres ensayos independientes. Los resultados están expresados relativos a las células control. C, células control. (B) Estudio de los niveles de ARNm de *TP53* y *BRCA1* por RT-qPCR en células SH-SY5Y transfectadas con ASCAT, ASE2F1 o ASE2F2, y cosechadas 1 hora luego de exposición a luz UV. Los datos representan la media $\pm$ S.E.M. de tres ensayos independientes. Los resultados están expresados relativos a la condición ASCAT.

En conclusión, el conjunto de los resultados sugieren que luego de irradiación UV, E2F1 y E2F2 se unen a sus sitios consenso en los promotores de los genes supresores tumorales *TP53* y *BRCA1* promoviendo su expresión.

# Conclusiones



## Conclusiones

- *E2F1* y *E2F2* son inducidos transcripcionalmente en respuesta al daño al ADN. Dicha inducción requiere de la actividad de las quinasas ATM/ATR y MEK. La inducción de *E2F2* fue observada exclusivamente en células neuronales.
- Los niveles proteicos de *E2F1* y *E2F2* aumentan por injuria genotóxica en células neuronales por dos contribuciones: estabilización post-traducciona l y síntesis *de novo* de la proteína.
- *E2F1* y *E2F2* inducidos por daño contribuyen al mantenimiento de la integridad genómica de células neuronales al disminuir la acumulación de lesiones al ADN y la apoptosis por injuria genotóxica, promoviendo así la supervivencia celular.
- *E2F1* y *E2F2* cumplen un rol no-transcripcional en respuesta al daño al ADN en células neuronales. Ambos factores son reclutados a sitios de lesión de tipo oxidativo e inducido por luz UV, donde interactúan con el factor de señalización de daño al ADN  $\gamma$ H2AX. *E2F2*, al igual que fue reportado en estudios previos para *E2F1*, favorece la formación de *foci* de Rad51 e induce la acetilación de histonas luego de injuria genotóxica.
- En respuesta al daño al ADN, *E2F1* y *E2F2* desempeñan un rol transcripcional en células neuronales, al unirse a sus sitios consenso en los promotores de *TP53* y *BRCA1* y promover la expresión de dichos genes supresores tumorales.

# Discusión



El ADN se encuentra continuamente expuesto a una gran variedad de agentes genotóxicos endógenos –ROS, errores de apareamiento e hidrólisis de bases– y exógenos –radiación UV, radiación ionizante y agentes químicos industriales– (Jackson and Bartek 2009; Lord and Ashworth 2012). Es por ello que, a lo largo de la evolución, se han seleccionado diversos sistemas de reparación capaces de detectar la lesión, señalar su presencia y promover su reparación (Harper and Elledge 2007).

Dentro del sistema nervioso, respuestas apropiadas al daño al ADN son requeridas para mantener la homeostasis celular y prevenir enfermedades. La respuesta del sistema nervioso al daño al ADN está relacionada con la dinámica de desarrollo de dicho sistema. El sistema nervioso en desarrollo es altamente susceptible a la muerte celular por apoptosis inducida por daño al ADN, mientras que las consecuencias de la injuria genómica en el sistema nervioso maduro no se encuentran completamente establecidas. Durante el desarrollo del sistema nervioso, un período caracterizado por replicación celular y diferenciación, el daño al ADN activa predominantemente apoptosis en lugar de reparación del ADN porque es igual de eficiente, y probablemente más seguro, reemplazar la célula perdida. En contraste, la reparación del ADN dañado es importante en el mantenimiento de la integridad genómica del sistema nervioso maduro (Lee and McKinnon 2007). El correcto funcionamiento de los mecanismos de reparación en células neuronales maduras es de vital relevancia dado que las mismas son células post-mitóticas altamente diferenciadas que no pueden ser, en su gran mayoría, reemplazadas en caso de trauma o enfermedad.

Las consecuencias dramáticas de enfermedades neurodegenerativas enfatizan la importancia de mecanismos que promueven la supervivencia y la plasticidad neuronal. De esta manera, la identificación de factores neuroprotectores y de supervivencia neuronal es clave para la comprensión de la progresión de desórdenes de neurodegeneración por injuria y para el diseño de terapias acordes para su tratamiento (McKinnon 2009). En este contexto, y por su reportada participación en la respuesta al daño al ADN, los miembros de la familia de factores de transcripción E2F resultan de particular interés como potenciales factores neuroprotectores.

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo principal estudiar la participación de los factores de la familia E2F en el mantenimiento de la integridad genómica en células neuronales, y evaluar su potencial papel como factores de supervivencia neuronal.

## E2F1 y E2F2: factores de supervivencia neuronal

### 1. Inducción: dos contribuciones consecutivas en el tiempo

Los resultados presentados en esta tesis demuestran la existencia de dos contribuciones seguidas en el tiempo que conducen al incremento de los niveles de E2F1 y E2F2 por injuria genotóxica: la estabilización proteica por modificaciones post-traduccionales, seguida de la inducción transcripcional de *E2F* y la consecuente síntesis *de novo* de la proteína. Es importante enfatizar que en este trabajo se demostró por primera vez que E2F2 es inducido por estrés genotóxico a nivel transcripcional y proteico, y que cumple un rol crítico en la respuesta al daño al ADN.

La respuesta de E2F1 al daño al ADN ha sido tema de estudio de interés durante los últimos 15 años. Numerosas publicaciones han demostrado que luego de estrés genotóxico E2F1 sufre diversas modificaciones post-traduccionales –que incluyen fosforilaciones y acetilaciones principalmente–, las cuales resultan en la estabilización de la molécula proteica (Lin, Lin et al. 2001; Stevens, Smith et al. 2003; Ianari, Gallo et al. 2004). En este trabajo se presentaron evidencias que sugieren que E2F2 es también estabilizado por un mecanismo post-traduccional por la acción de genotóxicos. Se observó que una proteína E2F2 exógena es capaz de ser estabilizada por luz UV y, por otro lado, se corroboró la estabilización de E2F1 ya reportada debido a que una proteína E2F1 exógena también mostró el mismo comportamiento. De esta manera, se puede concluir que en células neuronales existe una estabilización de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN. Futuros experimentos diseñados para establecer el tipo de modificaciones post-traduccionales que sufre E2F2 y las enzimas responsables de dichas modificaciones son de suma importancia para completar la caracterización de este mecanismo de estabilización proteica por acción genotóxica.

Nuestros resultados señalan un mecanismo transcripcional para la inducción de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN. Se determinó que luego de injuria genotóxica existe una inducción de la transcripción de *E2F1* y *E2F2*, para este último específicamente en células neuronales, siendo tal inducción una respuesta general para distintas especies y diversos tipos de lesión al ADN. Esto es debido a que el estudio llevado a cabo englobó el uso de cultivos celulares provenientes de diferentes especies –humano, ratón y rata–, los cuales fueron sometidos al tratamiento con genotóxicos que difieren en su mecanismo de acción y lesión resultante al ADN: NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y UV. A su vez, se

demostró que la inducción transcripcional de *E2F1* y *E2F2* en células neuronales requiere de la actividad de las quinasas ATM/ATR y MEK. Los elevados niveles de transcripto de *E2F1* y *E2F2* son traducidos dando lugar a un incremento de los niveles proteicos de tales factores de transcripción. Por lo tanto, nuestros resultados indican que en células neuronales ocurre una inducción transcripcional de *E2F1* y *E2F2* en respuesta al daño al ADN, la cual conlleva a la síntesis *de novo* de estos factores, aumentando así sus niveles proteicos.

Un trabajo reciente ha indicado que los genes *E2F* activadores -*E2F1*, *E2F2* y *E2F3a*- son inducidos transcripcionalmente en células de osteosarcoma humano Saos2 luego del tratamiento con el agente quimioterapéutico doxorubicina (Martinez, Goluszko et al. 2010). En esta tesis no se detectó un incremento del transcripto de *E2F3a* con las líneas celulares y los insultos genotóxicos empleados. Además, solo se observaron mayores niveles de ARNm de *E2F2* en respuesta al daño al ADN específicamente en células neuronales. Se puede especular que la discrepancia entre los resultados puede deberse al tipo celular analizado y a la dosis del agente genotóxico utilizada. De todas maneras, dado a que en este trabajo se llevó a cabo un amplio estudio de las variaciones en los niveles de ARNm de los miembros de la familia *E2F1* a *E2F5* luego de la exposición a diversos agentes genotóxicos en una variedad de cultivos celulares provenientes de diferentes tejidos y especies; proponemos que en respuesta al daño al ADN existe un mecanismo generalizado que resulta en la inducción transcripcional de *E2F1* y *E2F2*, estando la inducción de *E2F2* restringida a células de tipo neuronal.

Nosotros presumimos que la especificidad neuronal de la inducción de *E2F2* está regulada por la actividad de EGR-1 (*early growth response protein 1*). El factor de transcripción EGR-1, el cual es expresado en el sistema nervioso, podría estar involucrado en la regulación transcripcional de *E2F2* tras estrés genotóxico (Beckmann and Wilce 1997). EGR-1 se ajusta como un potencial candidato debido a que es inducido a nivel de ARNm y proteína en respuesta al daño al ADN (Quinones, Dobberstein et al. 2003; Shin, Kim et al. 2013). Más aún, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el tratamiento con NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o UV en células neuronales conduce a un incremento de los niveles de transcripto y proteicos de EGR-1 (Belluscio, Giono et al. 2011). Por otro lado, se ha reportado que el factor EGR-1 promueve la supervivencia celular en respuesta a radiación UV e ionizante (Hallahan, Dunphy et al. 1995; Huang, Fan et al. 1998). A partir de estas evidencias, sugerimos que el factor de transcripción



EGR-1 es un regulador río arriba de la inducción de *E2F1* y *E2F2* en respuesta al daño al ADN. Si bien los promotores de *E2F1* y *E2F2* poseen varios sitios potenciales de unión para EGR-1, especulamos que en el promotor de *E2F2* en células neuronales EGR-1 requeriría de la asociación a factores co-activadores necesarios para promover la transcripción de dicho *E2F* en respuesta a injuria genotóxica.

Por último, cabe destacar que la temporalidad de las contribuciones de estabilización proteica y de inducción transcripcional explica el aumento sostenido de *E2F1* y *E2F2* en el tiempo luego de daño al ADN. Por un lado, la estabilización de *E2F1* y *E2F2* ocurre tempranamente, alrededor de 1 o 2 horas post-tratamiento genotóxico. Por otro lado, la inducción de los niveles de ARNm de *E2F1* y *E2F2* comienza 2 horas post-daño al ADN, alcanzando máximos niveles entre las 4 y 8 horas post-daño. De esta manera, la estabilización temprana de *E2F1* y *E2F2* por modificaciones post-traduccionales justifica el aumento de los niveles proteicos en un punto temporal previo a la inducción transcripcional del gen. Por lo tanto, el incremento de los niveles proteicos de *E2F1* y *E2F2* entre 1 y 12 horas post-tratamiento genotóxico aproximadamente, está dado por una estabilización proteica temprana, seguida de un aumento de la síntesis *de novo* de la proteína producto de la traducción de los elevados niveles de ARNm.

## 2. Mecanismo de acción

Los factores *E2F1* y *E2F2* inducidos por daño al ADN en células neuronales contribuyen al mantenimiento de la integridad genómica al promover la reparación del ADN, conduciendo a una reducida respuesta apoptótica y a una incrementada supervivencia celular. Dicha resistencia a la injuria genotóxica la logran al desempeñar dos roles: por un lado, un rol transcripcional, regulando la expresión de genes que promueven la supervivencia neuronal; y, por otro lado, mediante un rol no-transcripcional, al localizarse en sitios de lesión al ADN y favorecer el reclutamiento de factores de reparación y enzimas remodeladoras de la cromatina.

El rol transcripcional de *E2F1* y *E2F2* radica en su capacidad de regular la expresión de genes que contribuyen a la supervivencia celular. En este trabajo, mediante ensayos de actividad CAT, se determinó que los factores *E2F1* y *E2F2* inducidos por estrés genotóxico son activos en sus actividades reguladoras de la transcripción. Este hecho nos alentó a estudiar la potencial asociación de *E2F1* y *E2F2* a los promotores de genes relacionados con la respuesta al daño al ADN. De esta manera, se demostró mediante

ensayos de ChIP-qPCR que, luego de la exposición a luz UV, ambos factores aumentan la unión a su sitio consenso en los promotores de dos genes supresores tumorales: *TP53* y *BRCA1*. A su vez, se observó que E2F1 y E2F2 activan la expresión de tales genes en respuesta a irradiación UV. Se sabe que p53 y BRCA1 están involucrados en el mantenimiento de la integridad del genoma ya que ambos participan en la vía DDR promoviendo la activación de los puntos de control del ciclo celular, la reparación del ADN o la muerte celular por apoptosis en caso que las lesiones al ADN no puedan ser reparadas (Deng 2006; Kruse and Gu 2009). Ambos supresores tumorales han sido caracterizados como factores neuroprotectores que promueven la supervivencia neuronal y previenen la progresión de procesos neurodegenerativos (Raina, Hochman et al. 2001; Evans, Raina et al. 2007; Tedeschi and Di Giovanni 2009; Jeon, Kim et al. 2012). En este sentido, el hecho que E2F1 y E2F2 participen en la activación transcripcional de *TP53* y *BRCA1*, es coherente con el rol neuroprotector y promotor de supervivencia neuronal propuesto para estos factores de transcripción.

La regulación transcripcional de *TP53* y *BRCA1* por los factores E2F ha sido descripta anteriormente. La regulación de p53 luego de un estrés genotóxico ha sido estudiada principalmente a nivel proteico –control de la traducción, modificaciones post-traduccionales, interacciones proteína-proteína y localización subcelular–, pero poco se sabe de su regulación a nivel transcripcional (Halaby and Yang 2007; Gu and Zhu 2012). Se ha reportado que E2F1 se une a su sitio consenso y promueve la expresión de *TP53* luego del tratamiento con los agentes etopósido o antraciclina (Bug and Dobbelstein 2011; Massip, Arcondeguy et al. 2013). Por otra parte, se ha determinado que en condiciones de hipoxia –característica de microambientes tumorales– se observa una represión de la expresión de *BRCA1* producido por un cambio en la unión a los sitios consenso para E2F por complejos represores E2F4-p107/p130 en lugar de complejos E2F activadores. Dicha represión está asociada con una mayor inestabilidad genómica ya que previene la reparación del ADN por HR y promueve la vía NHEJ, propensa a cometer errores (Bindra, Gibson et al. 2005).

Consistente con nuestros resultados, trabajos previos han señalado la regulación transcripcional por los factores E2F de diversos genes que codifican proteínas involucradas en los sistemas de reparación del daño al ADN. E2F1 participa en la inducción de la transcripción de los genes *XRCC1* y *UNG* –participantes del mecanismo BER–; *DDB2*, *RPA2* y *RPA3* –pertenecientes al mecanismo NER–; *Rad51*

-recombinasa crucial en la vía HR-; *PRKDC* -que codifica a la enzima DNA-PK involucrada en el mecanismo NHEJ-; y *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* -factores de la vía MMR- (Polager, Kalma et al. 2002; Ren, Cam et al. 2002; Iwanaga, Komori et al. 2004; Youn, Cho et al. 2005; Prost, Lu et al. 2007; Chen, Yu et al. 2008). De esta manera, E2F1 contribuye a la reparación del ADN, asegurando la integridad genómica y favoreciendo la supervivencia celular. Además, vale destacar que dado que los factores E2F están estrechamente relacionados con el ciclo celular y la replicación del ADN, es esperable que a su vez promuevan la reparación del mismo para evitar la acumulación de errores en el genoma generados durante la replicación (Nevins, Leone et al. 1997). En otras palabras, existe una asociación evolutiva entre las maquinarias de replicación y reparación del ADN gracias a la acción de los factores de transcripción E2F, la cual permite el mantenimiento de la estabilidad genómica. Por otro lado, estudios han demostrado la regulación transcripcional por E2F1 de genes anti-apoptóticos, como por ejemplo *Bcl-2* (Muller, Bracken et al. 2001). Teniendo en cuenta los resultados presentados en este trabajo de tesis y en reportes previos, proponemos que E2F1 y E2F2 desempeñan un rol transcripcional que contribuye a la supervivencia neuronal y neuroprotección mediante la regulación de la transcripción de genes supresores tumorales, genes de reparación del ADN y genes anti-apoptóticos.

Por otra parte, E2F1 y E2F2 llevan a cabo un rol no-transcripcional al localizarse en sitios de lesión al ADN, donde favorecen el reclutamiento de factores de reparación y enzimas remodeladoras de la cromatina. En esta tesis se demostró que ambos factores de transcripción son reclutados a sitios de daño oxidativo e inducidos por luz UV. Además, se determinó que se asocian al factor de señalización de daño  $\gamma$ H2AX. Por último, se observó que E2F2 promueve la formación de *foci* de Rad51 en respuesta al tratamiento con NCS, y que interacciona con la acetiltransferasa GCN5 e induce la acetilación de la histona H4 luego de irradiación UV. Dichos resultados concuerdan con reportes previos, en los cuales se determinó que E2F1 se localiza en sitios de lesión inducidos por UV, donde favorece la reparación del daño al ADN al reclutar a GCN5 y promover la acetilación de H3 en Lys9, incrementando de esta manera la accesibilidad de la maquinaria de reparación del ADN a sitios de daño. A su vez, E2F1 promueve el reclutamiento de factores involucrados en la vía de reparación NER -p62, XPC y XPA- a sitios de lesión luego de irradiación UV, y de factores de la vía HR -Nbs1 y Rad51- a

DSBs en respuesta al tratamiento con NCS o radiación gamma (Guo, Chen et al. 2010; Chen, Zhu et al. 2011; Guo, Chen et al. 2011).

Por lo tanto, los roles no-transcripcional y transcripcional de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN señalan a estos factores de transcripción como potenciales proteínas mediadoras y efectoras respectivamente en la vía de señalización DDR. Por un lado, el papel no-transcripcional de E2F1 y E2F2 los coloca como posibles moléculas mediadoras de la respuesta al daño. Estas últimas son responsables de amplificar la cascada de señalización al proveer una plataforma para el reclutamiento de proteínas efectoras en un sitio cercano a las proteínas apicales sensoras. E2F1 y E2F2 cumplen con esta premisa debido a que se localizan en sitios de daño y promueven a su vez el reclutamiento de factores efectoras involucrados en la reparación del ADN y remodelado de la cromatina. Además, se sabe que la fosforilación de la histona H2AX en Ser139 en los sitios de lesión constituye una marca para el anclaje a los *foci* de daño de diversas proteínas mediadoras (Fernandez-Capetillo, Lee et al. 2004). En este trabajo se demostró una asociación entre E2F1 o E2F2 con  $\gamma$ H2AX luego del daño inducido por NCS, reforzando el concepto de E2F1 y E2F2 como moléculas mediadoras de la vía DDR. Por otro lado, los factores E2F1 y E2F2 pueden ser considerados proteínas efectoras en la cascada DDR según su rol transcripcional promotor de supervivencia celular. Los efectoras forman parte de un amplio y diverso grupo compuesto por proteínas con distinta funcionalidad, las cuales modulan numerosas respuestas interconectadas que actúan en el mantenimiento de la homeostasis celular frente al daño al ADN. Entre ellas, se incluye a reguladores del ciclo celular y factores de la maquinaria de transcripción, como lo son E2F1 y E2F2. Además, se sabe que dichas moléculas efectoras son generalmente blanco de fosforilación. Se ha reportado que E2F1 es fosforilado por ATM, ATR y Chk2 (Lin, Lin et al. 2001; Stevens, Smith et al. 2003). E2F2 carece del sitio de fosforilación por ATM/ATR en el extremo N-terminal que está presente en E2F1. Por el contrario, el único sitio potencial de fosforilación por ATM/ATR en E2F2 se encuentra en su dominio de dimerización (Lin, Lin et al. 2001). Además, el sitio de fosforilación por Chk2 en E2F1 tampoco se encuentra conservado en los otros miembros de la familia E2F (Stevens, Smith et al. 2003). De esta manera, resulta interesante como objetivo futuro determinar cuáles son las modificaciones post-traduccionales que E2F2 sufre en respuesta al daño al ADN y conllevan a su estabilización; en particular, aquellas potenciales fosforilaciones.

### 3. En supervivencia neuronal

Los factores E2F presentan un rol dicotómico en respuesta al daño al ADN ya que son capaces de promover sucesos contrarios como lo son la muerte celular programada o la supervivencia celular. Dicha capacidad dual radica en la plasticidad funcional que presentan estos factores de transcripción. Dependiendo del tipo celular, estadio de desarrollo y la señal de injuria genotóxica, los miembros de la familia E2F pueden promover o antagonizar apoptosis (DeGregori 2005; DeGregori and Johnson 2006). En este trabajo se demostró que, en un modelo celular neuronal, los factores E2F1 y E2F2 favorecen la supervivencia celular y previenen el gatillado de muerte celular programada en respuesta al daño al ADN inducido por los genotóxicos NCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y UV.

En concordancia con nuestro estudio, trabajos previos han implicado a E2F1 en la supervivencia celular. Se determinó que ratones transgénicos E2F1 <sup>-/-</sup> presentan elevados niveles de apoptosis de sus queratinocitos en respuesta a irradiación UV-B, mientras que la sobreexpresión de E2F1 en dichas células epidérmicas previene la muerte celular por apoptosis inducida por UV-B. Además, la inhibición de la apoptosis por luz UV-B está correlacionada con una mayor eficiencia en la remoción de fotoproductos del ADN (Wikonkal, Remenyik et al. 2003; Berton, Mitchell et al. 2005). Otros reportes han demostrado que en respuesta al daño al ADN y fosforilación por ATM, la actividad apoptótica de E2F1 es inhibida al asociarse con TopBP1, resultando dicha interacción en la relocalización de E2F1 en *foci* de reparación de BRCA1 (Liu, Lin et al. 2003). E2F1 también participa en el reclutamiento a horquillas de replicación del complejo de recombinación MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) mediante la interacción con el extremo N-terminal de Nbs1, suprimiendo así la replicación del ADN en respuesta al daño al ADN al activar el punto de control del ciclo celular de fase S (Maser, Mirzoeva et al. 2001). Más aún, se ha reportado una reducida reparación del ADN en fibroblastos embrionarios de ratón E2F1 <sup>-/-</sup> sometidos al tratamiento con el agente alquilante metil metano sulfonato (Chen, Yu et al. 2008). Por lo tanto, en conjunto, estas evidencias indican un rol para E2F1 en la reparación del ADN, la activación de los puntos de control del ciclo celular y la inhibición de la muerte celular programada por estrés genotóxico. Los resultados de esta tesis son consistentes con dichas evidencias ya que proponen a E2F1, y también a E2F2, como factores neuroprotectores involucrados en el

mantenimiento de la integridad genómica de células neuronales expuestas a injuria genotóxica.

En primer lugar, en este estudio se determinó que la inducción de E2F1 y E2F2 en respuesta a estrés genotóxico disminuye la acumulación de lesiones al ADN. Esto se determinó al medir los niveles del marcador de injuria genómica  $\gamma$ H2AX. La sobreexpresión de E2F1 y E2F2 condujo a la protección de células neuronales expuestas a luz UV contra la acumulación de lesiones al ADN; mientras que el bloqueo de la inducción de E2F1 y E2F2 produjo un incremento de los niveles de  $\gamma$ H2AX luego del tratamiento con NCS,  $H_2O_2$  o UV, y también previno la eficiente remoción de las lesiones CPD tras irradiación UV. Por otro lado, los resultados señalan que el aumento de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN inhibe la respuesta apoptótica. El bloqueo de la inducción de E2F1 y E2F2 conllevó a un aumento en la activación y actividad de la enzima caspasa-3. Nosotros especulamos que la disminuida respuesta apoptótica luego de injuria genotóxica es consecuencia de una reducción en la acumulación de lesiones en el genoma por una mayor capacidad de reparación del ADN. Por último, en este trabajo se determinó que la supervivencia y viabilidad celular, evaluadas mediante ensayos de MTT y clonogénicos, se encuentran comprometidas al bloquear la inducción de E2F1 y E2F2 en células neuronales sometidas a tratamiento genotóxico. El ensayo de MTT está basado en la actividad metabólica celular debido a que mide la conversión de MTT en cristales insolubles de formazán por células vivas, siendo dicha conversión proporcional a la actividad mitocondrial. Por otro lado, el ensayo clonogénico asume que cuando un célula se encuentra viva, posee la capacidad de dividirse y proliferar, dando lugar a colonias. Se sabe que este último método es más sensible que el ensayo de MTT (Carmichael, DeGraff et al. 1987). De esta manera, sugerimos que la diferencia en supervivencia celular entre células transfectadas con ASCAT o ASE2F1 no fue considerable para ser detectada por el ensayo de MTT, pero sí fue suficiente para ser distinguida mediante el ensayo clonogénico.

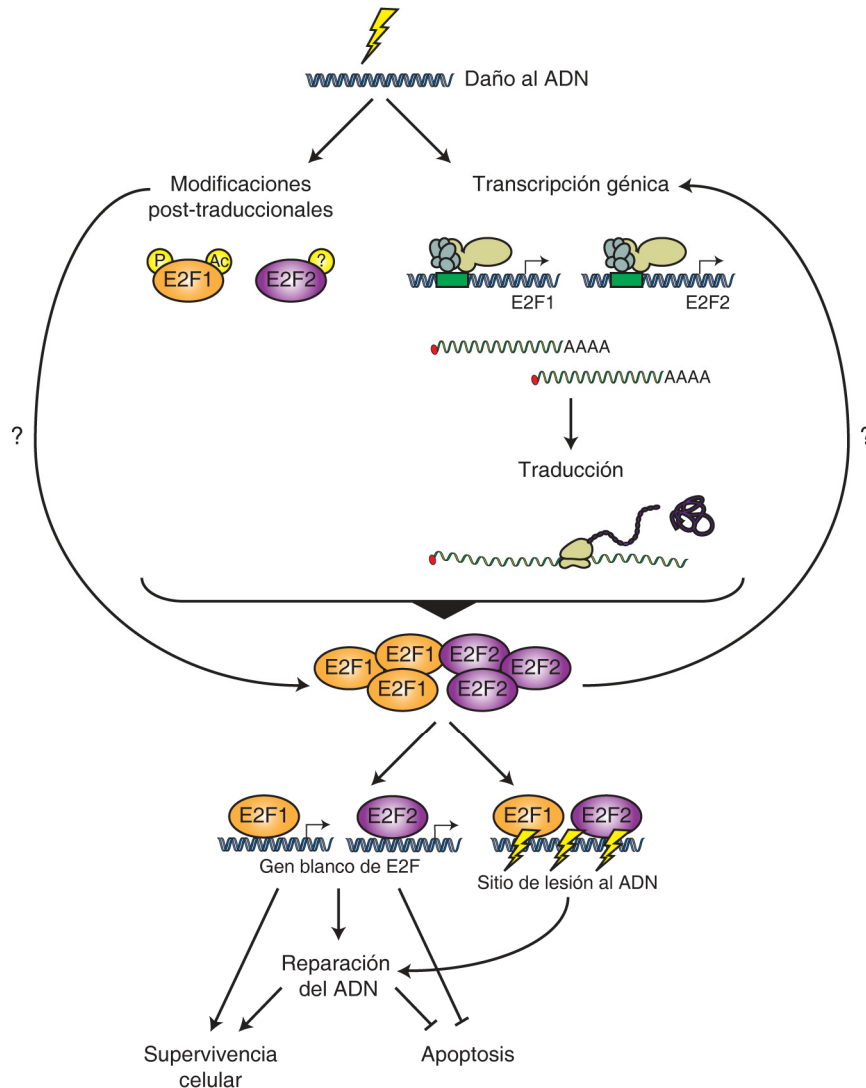
Los factores E2F activadores pueden comportarse como oncogenes o bien como supresores tumorales dependiendo del contexto celular (Field, Tsai et al. 1996; Yamasaki, Jacks et al. 1996; Zhu, Field et al. 2001). La actividad oncogénica está dada por su capacidad de promover la proliferación celular, mientras que la supresión tumoral ha sido asociada comúnmente a sus funciones pro-apoptóticas. En este trabajo se determinó que E2F1 y E2F2 reducen la respuesta apoptótica, se localizan en sitios de

lesión al ADN y estimulan la reparación del ADN luego de estrés genotóxico. Dichas observaciones son consistentes con evidencias previas que proponen que en ciertos casos la actividad supresora tumoral de E2F1 no está ligada a su regulación apoptótica, sino que es producto de sus funciones no-transcripcionales que favorecen la reparación del ADN (Biswas and Johnson 2012). Estudios previos han señalado que E2F1 se localiza en sitios de lesión inducidos por luz UV o en DSBs, donde promueven el reclutamiento de factores de reparación del ADN y enzimas remodeladoras de la cromatina (Guo, Chen et al. 2010; Chen, Zhu et al. 2011; Guo, Chen et al. 2011). Nuestros resultados añaden un nuevo componente a este rompecabezas: E2F2. En este trabajo se demostró que en respuesta al daño al ADN, E2F1 y E2F2 son reclutados a sitios de daño oxidativo e inducidos por luz UV, se asocian al factor de señalización de daño  $\gamma$ H2AX y a la acetiltransferasa GCN5, inducen la acetilación de histonas y promueven la formación de *foci* de Rad51. Además de dicho papel no-transcripcional, el rol transcripcional de E2F1 y E2F2 promotor de supervivencia celular que antagoniza la respuesta apoptótica descrito en esta tesis también contribuiría a la actividad supresora tumoral de estos factores de transcripción.

En último lugar, es importante tener en cuenta que la inducción transcripcional de E2F1 y E2F2 en células neuronales requiere de la actividad de las quinasas ATM/ATR y MEK. Se sabe que la vía de señalización de las quinasas MAP (*mitogen-activated protein*), en la cual MEK es una de las quinasas involucradas, está asociada con señales de supervivencia celular. Esto está mediado –al menos parcialmente– por la activación de los miembros de la familia RSK (*ribosomal S6 kinase*). Estos últimos, por un lado, fosforilan al factor pro-apoptótico Bad, inhibiendo su actividad; y, por otro lado, fosforilan y activan al factor de transcripción CREB (*cAMP response element-binding protein*), el cual promueve la transcripción de *Bcl-2*, estimulando así la supervivencia celular. Por lo tanto, la vía de las quinasas MAP inhibe el programa apoptótico al afectar la actividad de las proteínas Bad y CREB (Bonni, Brunet et al. 1999; Yuan and Yankner 2000). De esta manera, es congruente que la vía de las quinasas MAP, transductora de señales de supervivencia celular, induzca la expresión de E2F1 y E2F2, los cuales –según los resultados presentados en esta tesis– también están involucrados en promover la supervivencia celular frente al daño al ADN.

#### 4. Modelo propuesto

El conjunto de los resultados obtenidos nos permiten trazar un modelo para el papel de E2F1 y E2F2 como factores neuroprotectores (*Figura I*).



**Figura I. Mecanismo de acción de E2F1 y E2F2 en respuesta al daño al ADN en células neuronales.**

En respuesta al daño al ADN ocurre una inducción transcripcional de *E2F1* y *E2F2*, siendo la inducción de *E2F2* específica para células neuronales. Este mecanismo novedoso, el cual es común a la respuesta a diversos agentes genotóxicos y el cual se encuentra conservado en distintas especies, contribuye al incremento de los niveles proteicos de E2F1 y E2F2. A su vez, E2F2 es estabilizado tempranamente por un mecanismo post-traducciona l luego de injuria genotóxica al igual que fue reportado previamente para E2F1. Por lo tanto, existen dos mecanismos consecutivos en el



tiempo que conducen al aumento de E2F1 y E2F2 luego de daño al ADN: la estabilización proteica por modificaciones post-traduccionales de la proteína E2F ya sintetizada, seguida de la inducción de la transcripción del gen *E2F* y la consecuente síntesis proteica *de novo*. Nosotros proponemos que los factores E2F1 y E2F2 sintetizados *de novo* podrían también ser blanco de estabilización proteica por modificaciones post-traduccionales y, por otro lado, que el *pool* total de E2F1 y E2F2 inducidos por daño al ADN podría participar en un mecanismo autoregulatorio al promover su propia expresión en respuesta a estrés genotóxico. De esta manera, los elevados niveles de los factores E2F1 y E2F2 contribuyen al mantenimiento de la integridad genómica y a la resistencia a la injuria genotóxica al promover la reparación del ADN, conllevando a una reducida respuesta apoptótica y a una incrementada supervivencia celular. Dicho papel lo ejercen mediante un rol transcripcional, activando diversos genes blanco que favorecen la supervivencia; y, además, mediante un rol no-transcripcional, localizándose en sitios de lesión al ADN y promoviendo el reclutamiento de factores de reparación y proteínas remodeladoras de la cromatina.

## 5. Esencia

Las neuronas son únicas dentro de la miríada de tipos celulares existentes. La combinación de su función crítica, naturaleza post-mitótica, número finito y elevado metabolismo requiere de mecanismos de defensa elaborados, tiempo y espacio específicos, para asegurar su longevidad y funcionalidad (Barzilai, Biton et al. 2008).

Una respuesta apropiada al daño al ADN es crítica para el normal desarrollo y organización del sistema nervioso, y para su mantenimiento a lo largo de la vida del organismo. La vía DDR activa una de dos alternativas: una red de supervivencia que incluye la activación de los puntos de control del ciclo celular, reparación del ADN, alteraciones en los perfiles de expresión génica, síntesis proteica, degradación y tráfico celular, y procesamiento del ARN; o bien la muerte celular programada por apoptosis (Jackson and Bartek 2009; Roos and Kaina 2013).

El malfuncionamiento de la vía DDR en células neuronales está asociado a la neurodegeneración. Diversas evidencias han señalado una conexión entre daño al ADN y neurodegeneración en desórdenes genéticos que afectan la vía DDR, en enfermedades neurodegenerativas, y en estudios de procesos de envejecimiento (Rass, Ahel et al. 2007; McKinnon 2009). Si bien las neuronas poseen actividad de reparación

del ADN, las lesiones al ADN son reparadas más lentamente en neuronas en relación a células proliferativas, sugiriendo que las lesiones tienden a acumularse (Nospikel and Hanawalt 2002; McMurray 2005; Vyjayanti and Rao 2006). Por ejemplo, el mecanismo de reparación NER-GGR se encuentra atenuado en neuronas, mientras que el mecanismo NER-TCR no estaría afectado (Nospikel and Hanawalt 2000). Se ha propuesto que, dado que las neuronas no replican su ADN, la remoción de lesiones al ADN de regiones no genómicas no esenciales puede ser dispensable, pero no de aquellas regiones transcripcionalmente activas requeridas para su correcto funcionamiento (Nospikel 2007). De esta manera, cuando las células neuronales post-mitóticas re-ingresan al ciclo celular con el objetivo de reparar el daño al ADN, la deficiencia para cumplir dicho objetivo hace que el intento resulte abortivo y culmine en la muerte neuronal por apoptosis, conduciendo a la neurodegeneración (Becker and Bonni 2004; Jacobsen, Beach et al. 2004; Kruman 2004; Vyjayanti and Rao 2006; Yang and Herrup 2007).

La re-entrada al ciclo celular en neuronas dañadas está asociada a mecanismos de supervivencia celular, ya que su objetivo es activar la maquinaria de reparación de lesiones al ADN. Debe existir un umbral de daño sobre el cual la vía de reparación del ADN dañado ya no es más activa, y una cascada de señalización de muerte celular se gatilla en su lugar para evitar un aumento en la carga de mutaciones que causan inestabilidad genómica (Barzilai 2007; Barzilai, Biton et al. 2008). Por lo tanto, existe un compromiso entre la reparación del daño al ADN y la muerte neuronal en caso que el daño sea excesivo y no pueda ser reparado. En neuronas del SNC, dicho compromiso tiene una gran importancia ya que la muerte celular causa una pérdida irremplazable. Cuando la muerte neuronal ocurre de manera desregulada, puede conducir a la progresión de desórdenes neurodegenerativos, apoplejía o trauma cerebral (Raghupathi, Graham et al. 2000; Yuan and Yankner 2000). En este contexto, la identificación de factores que permitan la reparación del ADN y la supervivencia neuronal, previniendo la muerte celular por apoptosis, es altamente deseable. E2F1 y E2F2 pueden incluirse dentro de este grupo de factores neuroprotectores. Su inducción luego de injuria genotóxica desplaza la respuesta celular hacia la supervivencia en vez de hacia la apoptosis neuronal. Esto se atribuye a su capacidad de promover la reparación de las lesiones al ADN, es decir, a su contribución en el mantenimiento de la estabilidad genómica en células neuronales.

# Materiales y Métodos



## 1. Cultivo de líneas celulares

### 1.1. Condiciones de crecimiento

Las líneas celulares HEK293, HepG2, HN9 y Neuro-2a fueron cultivadas en botellas T75 o placas de 100 mm y mantenidas en medio DMEM (Life Technologies) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, bicarbonato de sodio 3,7 g/l, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml en estufa a 37°C con una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> 5%. Las líneas celulares SH-SY5Y y PC12 fueron cultivadas en botellas T75 o placas de 100 mm y mantenidas en medio DMEM 45% Ham F12 45% (Life Technologies) conteniendo SFB 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, bicarbonato de sodio 2,4 g/l, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%.

### 1.2. Mantenimiento

Alcanzada una monocapa celular, el medio de cultivo fue aspirado y descartado, y las células se lavaron una vez con PBS (NaCl 0,14 M, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4) de modo de remover los inhibidores de tripsina presentes en el suero. A continuación se agregó, a cada botella o placa, 1 ml de solución de tripsina-EDTA 0,05% (Life Technologies) en PBS, seguido por una incubación a temperatura ambiente (o a 37°C en estufa) hasta observar al microscopio que las células estuvieran levantadas. El efecto de la tripsina se interrumpió por dilución con medio de cultivo. Posteriormente, se determinó el número y la viabilidad celular como se indica más adelante. Se plaqueó a una densidad de 1x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> en botellas T75 o en placas de 100 mm.

Las líneas celulares se mantuvieron en tubos de reserva en nitrógeno líquido generados a partir de aproximadamente 8x10<sup>6</sup> células en 1 ml de medio de cultivo conteniendo SFB 20% y dimetilsulfóxido (DMSO) 10%. Cada vez que fue necesario, los criotubos se descongelaron de manera rápida en baño térmico a 37°C y las células fueron transferidas a medio de cultivo completo previo lavado para eliminar el DMSO.

### 1.3. Determinación del número de células y su viabilidad

Para la determinación del número de células y su viabilidad se empleó el método de tinción por exclusión de azul tripán. Se realizó una dilución 1:2 de la suspensión celular

en una solución de azul tripán 0,4% (Sigma-Aldrich), de la cual se colocaron 10 µl en una cámara de Neubauer. Se llevó a cabo el recuento celular ( $N$ ) al microscopio óptico en los cuatro cuadrantes de dicha cámara, 1 a 3 minutos después del agregado del colorante. El número de células totales por ml y el porcentaje de viabilidad se determinaron aplicando las fórmulas (1) y (2) respectivamente.

$$(1) \frac{\text{Células}}{\text{ml}} = \frac{\sum N}{4} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

$$(2) \% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{células no teñidas}}{\text{células totales}} \times 100$$

## 2. Cultivos primarios de neuronas hipocámpales de rata

### 2.1. Preparación de las placas de cultivo

Placas de 35 mm fueron pretratadas con una solución de poli-L-lisina 1 µg/ml (Sigma P2636) diluida en buffer borato pH 8,5 durante 18 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, el exceso de poli-L-lisina fue eliminado mediante tres lavados de 30 minutos cada uno con agua milli-Q estéril. Las placas fueron cubiertas con medio DMEM y mantenidas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% hasta su utilización en la preparación de los cultivos.

### 2.2. Preparación de los cultivos primarios

Los cultivos de neuronas piramidales hipocámpales fueron obtenidos a partir de hipocámpos de embriones de rata Wistar de 18-19 días de gestación (Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires), según fue descrito por Cáceres (Caceres, Banker et al. 1986). Los hipocámpos extraídos y mantenidos a 0°C en solución salina balanceada Hanks 1X, fueron incubados durante 15 minutos a 37°C en 3 ml de solución de tripsina-EDTA 0,05% (Life Technologies) en PBS. A continuación, se descartó la tripsina y las células fueron lavadas tres veces con 2 ml de solución Hanks 1X a 37° C durante 2 minutos cada vez. Los hipocámpos se resuspendieron en 2-3 ml de medio DMEM completo y se disgregaron suavemente con pipetas Pasteur de vidrio de diámetro decreciente hasta lograr una suspensión homogénea de células. Luego se determinó el número de células en la suspensión y su viabilidad según se explicó anteriormente. Las células fueron plaqueadas en medio DMEM completo a una densidad de 1x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> en las placas preparadas

inicialmente, y mantenidas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% durante 2 horas. Transcurrido dicho tiempo, el medio DMEM fue reemplazado por medio Neurobasal (Life Technologies) conteniendo suplemento N2 1X, suplemento B27 1X, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Los cultivos fueron mantenidos en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% durante 1-2 días hasta ser utilizados en los diferentes experimentos.

### **3. Agentes genotóxicos**

#### **3.1. *Neocarzinostatina***

Las líneas celulares fueron incubadas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% en medio fresco conteniendo neocarzinostatina 50 ng/ml (NCS, Sigma N9162) durante 1 hora, y luego se reemplazó dicho medio por medio fresco dejando transcurrir los tiempos indicados en cada una de las diferentes determinaciones hasta su cosecha. Las células control fueron tratadas de la misma forma sin el agregado del dañador al medio fresco.

#### **3.2. *Peróxido de hidrógeno***

Las líneas celulares fueron incubadas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% en medio fresco conteniendo peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 100 µM durante 30 minutos, reemplazando a continuación dicho medio por medio fresco y dejando transcurrir los tiempos indicados en cada una de las diferentes determinaciones hasta su cosecha. Las células control fueron tratadas de la misma forma sin el agregado del dañador al medio fresco.

#### **3.3. *Irradiación ultravioleta***

Para irradiar las líneas celulares y los cultivos primarios, se removió el medio de las placas y las células fueron expuestas en placas abiertas a luz UV-C (UV) de 254 nm (rango 240-280 nm) a temperatura ambiente con una lámpara Philips TUV15WG15T8 calibrada para otorgar 2,5 J/m<sup>2</sup>.seg (Scassa, Marazita et al. 2007). Las líneas celulares fueron irradiadas con una dosis de 40 J/m<sup>2</sup>, mientras que los cultivos primarios recibieron una dosis de 20 J/m<sup>2</sup>. Finalizada la exposición, se readicionó medio fresco y las células fueron incubadas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% durante los tiempos indicados en cada caso hasta su cosecha. Las células control fueron tratadas de igual modo excepto por la exposición a luz UV.

#### 4. Agentes inhibidores de procesos de síntesis celular

Cuando fue indicado, las células fueron incubadas con actinomicina D 1  $\mu$ M (Sigma-Aldrich 856258) o cicloheximida 10  $\mu$ M (Sigma-Aldrich C7698) durante 3 horas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%, de modo de inhibir la síntesis de ARN o síntesis proteica respectivamente. Por otro lado, las células fueron también sometidas al tratamiento con agentes genotóxicos de la forma señalada anteriormente. En el caso de daño con NCS o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se adicionó el agente al medio conteniendo el inhibidor; mientras que para la irradiación UV, dicho medio fue removido y readicionado posteriormente de modo de llevar a cabo la irradiación a placa abierta. Transcurrido el tiempo de acción del agente genotóxico, se reemplazó el medio por medio fresco y las células fueron incubadas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% durante los tiempos indicados en cada ensayo.

#### 5. Agentes inhibidores de cascadas de transducción de señales

La incubación de las células con los diferentes inhibidores fue realizada de modo tal que estos ejercieran su acción durante 2 horas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%. Los inhibidores utilizados y sus concentraciones fueron las siguientes:

- Inhibidor de la vía ATM/ATR: cafeína 5 mM (Sigma-Aldrich C0750)
- Inhibidor de la vía ATM: KU-55933 10 mM (Abcam 120637)
- Inhibidor de la vía Ras/MAPK: PD-98059 10  $\mu$ M (Life Technologies PHZ1164)
- Inhibidor de la vía PI3K: LY-294002 50  $\mu$ M (Sigma-Aldrich L9908)
- Inhibidor de la vía JNK: SP-600125 25  $\mu$ M (Sigma-Aldrich S5567)

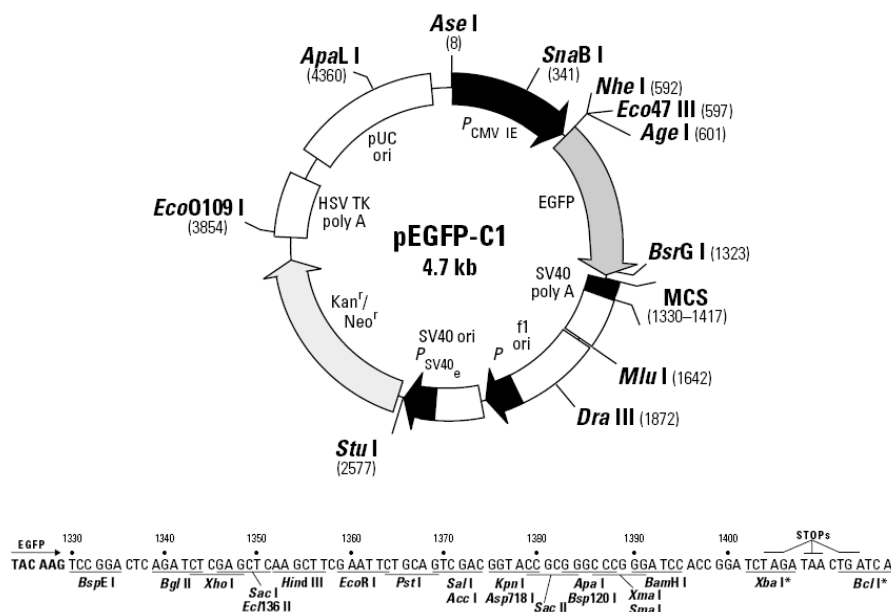
A su vez, las células fueron tratadas con los agentes genotóxicos como se indicó anteriormente. Para ello, en el caso de daño con NCS o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se adicionó el agente genotóxico al medio conteniendo el inhibidor; mientras que para la irradiación UV, dicho medio fue removido de modo de llevar a cabo la irradiación a placa abierta. Transcurrido el tiempo de acción del agente genotóxico, se reemplazó el medio por medio fresco y las células fueron incubadas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% durante los tiempos indicados en cada ensayo. Las células control fueron tratadas de igual forma aunque pre-incubadas con DMSO –compuesto utilizado como diluyente de los inhibidores–, con excepción de la cafeína, donde no se pre-incubó con ningún compuesto en particular dado que la misma fue disuelta en medio fresco.

## 6. Obtención y preparación de plásmidos

### 6.1. Plásmidos

Los plásmidos utilizados se describen a continuación:

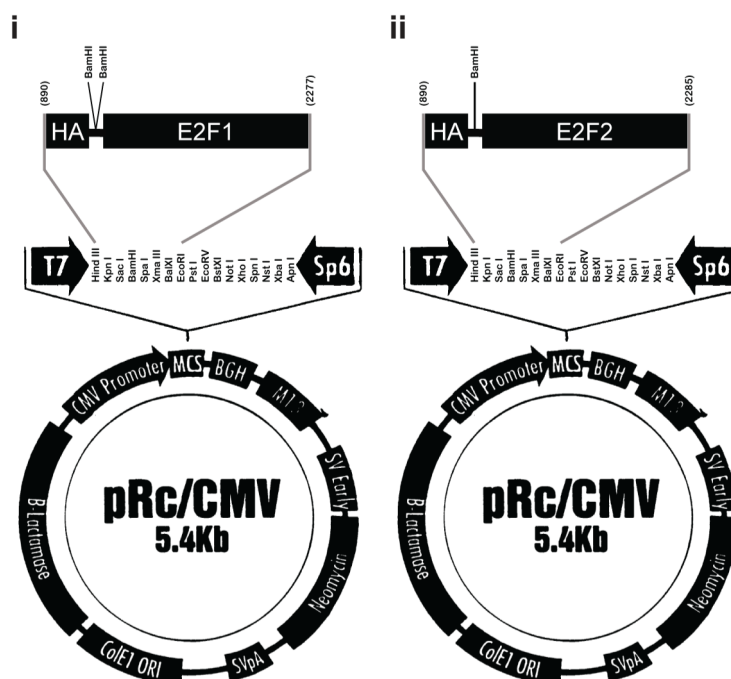
- **pE2F-CAT:** es un plásmido reportero que contiene cuatro copias del sitio consenso de unión para E2F río arriba de un promotor mínimo E2 seguido por el gen reportero cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en el vector pCAT3M; gentileza del Dr. Michael J. Imperiale, *University of Michigan Medical School*, Michigan, Estados Unidos (Harris, Christensen et al. 1998).
- **pΔE2F-CAT:** es un plásmido reportero que contiene una delección *XbaI/BglII* en el plásmido pE2F-CAT que remueve los cuatro sitios consenso de unión para E2F; gentileza del Dr. Michael J. Imperiale, *University of Michigan Medical School*, Michigan, Estados Unidos (Hiebert, Chellappan et al. 1992; Harris, Christensen et al. 1998).
- **pEGFP-C1:** es un plásmido que codifica para la proteína EGFP (variante de GFP *wild type* con máxima emisión a 507 nm), y que además permite la obtención de proteínas de fusión con el C-terminal de GFP al clonar el ADNc de la proteína de interés en el sitio múltiple de clonado (MCS), siempre y cuando dicha secuencia se encuentre en marco con la secuencia codificante de EGFP (*Figura I*).



**Figura I.** Mapa del plásmido pEGFP-C1 (Clontech) y su MCS según se indica en la parte inferior de la figura.



- **E2F1-GFP:** es un plásmido de expresión de E2F1 fusionado a EGFP, en el cual el ADNc humano de E2F1 *wild type* fue clonado en los sitios *HindIII/XbaI* del vector pEGFP-C1 (Clontech); gentilmente cedido por el Dr. David G. Johnson, *University of Texas MD Anderson Cancer Center*, Texas, Estados Unidos (Guo, Chen et al. 2010).
- **E2F2-GFP:** es un plásmido de expresión de E2F2 fusionado a EGFP, en el cual el ADNc humano de E2F2 *wild type* fue subclonado en el vector pEGFP-C1 (Clontech) en los sitios *BglII/XbaI* según se indica más adelante.
- **E2F1-HA:** es un plásmido de expresión de E2F1 fusionado a HA en su C-terminal, en el cual el ADNc de HA-E2F1 *wild type* humano fue clonado en el vector pRc/CMV (Life Technologies) en los sitios *HindIII/EcoRI* (Figura IIi); gentilmente cedido por el Dr. Miguel Campanero García, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Madrid, España (Krek, Ewen et al. 1994; Campanero and Flemington 1997).
- **E2F2-HA:** es un plásmido de expresión de E2F2 fusionado a HA en su C-terminal, en el cual el ADNc de HA-E2F2 *wild type* humano fue clonado en el vector pRc/CMV (Life Technologies) en los sitios *HindIII/EcoRI* (Figura IIii); cedido gentilmente por el Dr. Miguel Campanero García, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Madrid, España (Krek, Ewen et al. 1994; Campanero and Flemington 1997).



**Figura II.** Mapas de los plásmidos (i) E2F1-HA y (ii) E2F2-HA, en donde se muestran los sitios de inserción del ADNc HA-E2F1 o HA-E2F2 respectivamente en el MCS del vector pRc/CMV (Life Technologies).

- **JNK-HA:** es un plásmido de expresión de JNK fusionado a HA en su C-terminal, en el cual el ADNc de JNK *wild type* fue clonado en un vector pcDNA3; cedido gentilmente por el Dr. Omar Coso, IFIBYNE-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

## 6.2. Obtención de bacterias competentes

Las bacterias competentes se prepararon según el método Inoue (Inoue, Nojima et al. 1990). Brevemente, se inocularon 2 ml de medio SOB (peptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM) con bacterias *Escherichia coli* -cepa DH5 $\alpha$ - e incubaron con agitación constante a 37°C durante 17 horas. A continuación, se diluyó el cultivo a 25 ml con medio SOB y se incubó a 37°C con agitación vigorosa, hasta que alcanzó la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600}=0,55$ ). Se enfrió el cultivo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 2500 x g a 4°C. El pellet de bacterias fue resuspendido en 20 ml de buffer de transformación Inoue frío (MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 55 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 15 mM, KCl 250 mM, PIPES 10 mM pH 6,7). Las bacterias competentes se alicuotaron, congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C.

## 6.3. Transformación de bacterias competentes

Una pequeña cantidad de ADN plasmídico (50-100 ng) se incubó con 50-200  $\mu$ l de bacterias competentes en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las bacterias fueron sometidas a un shock térmico a 42°C durante 90 segundos, seguido de un enfriamiento rápido en hielo de 1-2 minutos. Luego se agregaron 800  $\mu$ l de medio SOC (se obtiene al adicionar al medio SOB MgCl<sub>2</sub> 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubó durante 45 minutos a 37°C. Las bacterias se centrifugaron a baja velocidad y se resuspendieron en 50  $\mu$ l de sobrenadante. Se sembraron en placas de Petri con LB agar (peptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%, agar 1,5%) con el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido: ampicilina 100  $\mu$ g/ml o kanamicina 20  $\mu$ g/ml. Se incubaron 16 horas en estufa a 37°C hasta la aparición de colonias.

## 6.4. Preparación de plásmidos en baja escala (miniprep)

Los plásmidos fueron preparados utilizando el kit de minipreparación plasmídica Wizard Plus (Promega A1330). Las bacterias transformadas con el plásmido a aislar fueron inoculadas en 3 ml de medio LB líquido (peptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%) con el antibiótico correspondiente: ampicilina 100  $\mu$ g/ml o kanamicina 20  $\mu$ g/ml. Se incubaron 16 horas a 37°C en agitación. Una vez obtenido el

pellet bacteriano, se prosiguió con la extracción plasmídica según las instrucciones del fabricante.

### **6.5. Preparación de plásmidos en gran escala (maxiprep)**

Los plásmidos fueron preparados utilizando el kit de maxipreparación plasmídica Wizard Plus (Promega A7270). Las bacterias transformadas con el plásmido a aislar fueron inoculadas en 250 ml de medio LB líquido con el antibiótico correspondiente –ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 20 µg/ml– e incubadas durante 16 horas a 37°C en agitación. Una vez obtenido el pellet bacteriano, se prosiguió con la extracción plasmídica según las instrucciones del fabricante.

### **6.6. Análisis de las preparaciones plasmídicas**

Con el objeto de determinar la calidad y concentración de las preparaciones, las mismas fueron sembradas con buffer de siembra 6X (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25%, xylene cyanol FF 0,25%) en un gel de agarosa 1% conteniendo bromuro de etidio 0,5 µg/ml, y resueltas por electroforesis a voltaje constante (5 V/cm) en buffer TBE 1X (Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8). Finalizada la corrida electroforética, los plásmidos fueron visualizados con el analizador de imágenes GBox SYNGENE utilizando el *software* GeneSys. Paralelamente, las preparaciones plasmídicas fueron cuantificadas espectrofotométricamente. La concentración del ADN se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm ( $DO_{260}=1$  equivale a 50 µg/ml de ADN), aceptando como criterio de pureza  $DO_{260/280}>1,5$  (Sambrook 1987).

## **7. Subclonado del ADNc de E2F2 en el vector pEGFP-C1**

La secuencia codificante de E2F2 fue obtenida al digerir el plásmido E2F2-HA con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xba*I. Por otro lado, el vector pEGP-C1 (Clontech) fue digerido en los sitios *Bgl*II/*Xba*I. Como el sitio *Xba*I es susceptible a metilación, los plásmidos a digerir fueron obtenidos a partir de la transformación de bacterias de la cepa JM110, las cuales son deficientes para las metilasas Dam y Dcm. A continuación, el inserto y el vector digeridos fueron purificados a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión 1% con el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) según las indicaciones del fabricante. Siendo *Bam*HI y *Bgl*II enzimas con extremos compatibles, se realizó la ligación del vector-inserto en una relación 1:7 con la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs) en un baño a 16°C durante 18 horas. El producto de ligación

fue utilizado para transformar bacterias competentes TOP10 (Life Technologies) según el protocolo descrito anteriormente. La fidelidad del plásmido obtenido fue analizada mediante secuenciación del ADN.

## 8. Disminución de los niveles de E2F1 y E2F2

La disminución de los niveles proteicos de E2F1 y E2F2 fue llevada a cabo mediante la estrategia de oligodeoxinucleótidos (ODNs) antisentido. De modo de introducir los ODNs ASE2F1 o ASE2F2, las células fueron transfectadas de modo de alcanzar una concentración final de 1  $\mu$ M –excepto para el ensayo clonogénico en el que se utilizó una concentración final de 0,5  $\mu$ M-. Acontecidas 18 horas post-transfección, las células fueron dañadas o no con los diversos agentes genotóxicos y cosechadas en los tiempos indicados en los ensayos correspondientes. Las células control fueron transfectadas con un ODN inespecífico ASCAT o ASLUC dependiendo del ensayo a realizar.

ASE2F1: 5'-CCC GAG CAG GGC CTC CAG CGC- 3'

ASE2F2: 5'-TCT GTG GGG CTC ATC GCG- 3'

ASCAT: 5'-TGA AAC TCA CCC AGG GAT TG-3'

ASLUC: 5'-GCA TAC GAC GAT TCT GTG ATT TG-3'

## 9. Disminución de la disponibilidad de los factores E2F

La disminución de la disponibilidad de los factores de la familia E2F fue llevada a cabo mediante la estrategia de ODNs *decoy*. Estos, debido a que poseen la secuencia consenso de unión para E2F, secuestran dichos factores de transcripción e impiden que ejerzan su acción sobre sus genes blanco. Se utilizaron dos ODNs *decoy*: uno conteniendo la secuencia de reconocimiento para los factores de transcripción E2F *wild type* (DOE2Fwt), y otro –empleado como control– que contiene tal secuencia mutada (DOE2Fmut). Con el objetivo de introducir dichos ODNs, las células fueron transfectadas de modo de obtener una concentración final de 1  $\mu$ M –excepto para el ensayo clonogénico en el que se utilizó una concentración final de 0,5  $\mu$ M-. Transcurridas 18 horas post-transfección, las células fueron dañadas o no con los diversos agentes genotóxicos y cosechadas en los tiempos indicados en los ensayos correspondientes.

DOE2Fwt: 5'-ATG CGC GAA ACG CGT TTT CGC GTT TCG CGC ATA GTT TTC T-3'

DOE2Fmut: 5'-ATC TAA ACG CGT TTT CGC GTT TAG ATT ATA GTT TTC T-3'

Las secuencias subrayadas corresponden a los sitios consenso de unión para E2F.

## **10. Transfección transitoria de líneas celulares**

Las líneas celulares fueron transfectadas con los plásmidos y/o ODNs indicados utilizando el compuesto Policación-polietilenimina (PEI, Polysciences 23966) o bien el reactivo Lipofectamine 2000 (Life Technologies), según las indicaciones del fabricante. Transcurridas 18 horas luego de la transfección, las células fueron dañadas o no con los diversos agentes genotóxicos y cosechadas en los tiempos señalados.

## **11. Análisis de ARN por Northern Blot**

### ***11.1. Aislamiento del ARN total***

El ARN total fue obtenido según el método descrito previamente (Chomczynski and Sacchi 1987), levemente modificado. Se partió de  $2 \times 10^6$  células en placas de 60 mm, se lavaron una vez con PBS, se agregaron 700  $\mu$ l de solución D desnaturalizante (isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM pH 7, N-laurilsarcosina 0,5%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M), se homogeneizaron con micropipeta y se trasvasaron a un tubo eppendorf. Todo el trabajo se realizó sobre hielo. Luego se agregaron 50  $\mu$ l de acetato de sodio 2 M pH 4,5, 400  $\mu$ l de fenol saturado en agua y 90  $\mu$ l de cloroformo-álcohol isoamílico (49:1). La suspensión fue agitada vigorosamente durante 10 segundos con un vórtex y centrifugada durante 20 minutos a 9500 rpm a 4°C. La fase superior acuosa se trasvasó a otro tubo y el ARN fue precipitado agregando 400  $\mu$ l de isopropanol y dejándolo hasta el día siguiente a -20°C. Se centrifugó a 9500 rpm durante 20 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 200  $\mu$ l de etanol 80%. Nuevamente, se realizó una centrifugación de 10 minutos a 9500 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 22  $\mu$ l de agua estéril libre de RNasas. La concentración del ARN se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm ( $DO_{260}=1$  equivale a 40  $\mu$ g/ml de ARN), aceptando como criterio de pureza  $DO_{260/280} > 1,7$  (Sambrook 1987).

### ***11.2. Electroforesis del ARN***

La separación electroforética del ARN total se realizó según una adaptación del método descrito por McMaster y Carmichael (McMaster and Carmichael 1977). Las muestras de ARN (10  $\mu$ g) se desnaturalizaron a 50°C durante 60 minutos en una

mezcla conteniendo glioxal 1,2 M, DMSO 7,5 M y buffer fosfato 10 mM pH 7 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4 mM). A continuación, las muestras fueron tratadas con buffer de siembra 6X y sembradas en gel de agarosa 1% preparado en buffer fosfato 10 mM pH 7. La corrida electroforética se llevó a cabo durante 1-2 horas a 100 mV en buffer fosfato 10 mM pH 7.

### ***11.3. Transferencia del ARN a la membrana***

Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue sometido a transferencia pasiva a una membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, GE Healthcare) según lo descrito por Sambrook (Sambrook 1987). Dicha membrana fue previamente humedecida durante 45 minutos en SSC 20X ( $\text{NaCl}$  3 M, citrato de sodio 0,4 M, pH 7). La transferencia se realizó por capilaridad ascendente en una solución de SSC 20X durante 16 horas. Posteriormente, la membrana de nylon se lavó 10-15 minutos con SSC 6X, se secó entre papeles Whatman 3MM durante 30 minutos a temperatura ambiente y se colocó en estufa a 80°C durante 1 hora para la fijación irreversible del ARN al nylon.

### ***11.4. Marcación de sondas***

Los ODNs utilizados como sondas fueron marcados radiactivamente en su extremo 5' con la enzima T4 polinucleótido quinasa. Se preparó la mezcla de reacción conteniendo 5 pmoles del ODN, 5 U de T4 polinucleótido quinasa (Life Technologies), buffer de reacción 1X provisto con la enzima y 50  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (6.000 Ci/mmol), en un volumen total de 30  $\mu\text{l}$ . Esta preparación se incubó 1 hora a 37°C. La sonda marcada fue purificada, para eliminar el nucleótido radioactivo no incorporado, mediante dos precipitaciones sucesivas con 1/2 volumen de acetato de amonio 7,5 M pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 2-3 horas a -80°C. Se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El precipitado fue resuspendido en 100  $\mu\text{l}$  de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4). Una alícuota de la sonda se colocó en un vial con líquido centellante a base de tolueno (PPO 0,4%, dimetil POPOP 0,05% en tolueno) y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Las sondas poseían una actividad específica aproximada de  $4\text{-}6 \times 10^3$  cpm/fmol.

Las sondas diseñadas se detallan a continuación:

Sonda para E2F1: 5'-CCC GAG CAG GGC CTC CAG CGC- 3'

Sonda para E2F2: 5'-TCT GTG GGG CTC ATC GCG- 3'

Sonda para E2F3a: 5'-CCC CCT CCC CAC CCC CGG- 3'

Sonda para E2F3b: 5'-AAC CTG CTG CTG TAA GGG- 3'

Sonda para E2F4: 5'-TTT TCG TGC CGG CTT GGA- 3'

Sonda para E2F5: 5'-GGC CCT GCC CCT GCC CTG- 3'

Sonda para  $\beta$ -tubulina: 5'-GCC CCT ATC TGG TTG CCG CAC TG- 3'.

Dado que el gen de la  $\beta$ -tubulina presenta expresión constitutiva, los resultados de los ensayos de Northern Blot fueron normalizados a los valores de los niveles del ARNm de  $\beta$ -tubulina detectados en paralelo.

### 11.5. Hibridización

Las membranas de nylon conteniendo el ARN fijado por calor fueron prehibridizadas en solución de bloqueo [SSC 6X, SDS 0,1%, Denhardt 2X (polivinilpirrolidona 0,04%, Ficoll 0,04%, seroalbúmina bovina 0,04%), ADN de espermatozoos de salmón 100  $\mu$ g/ml] durante 3 horas a 68°C en horno de hibridización con rotación. Posteriormente, la sonda marcada correspondiente fue agregada a la solución y la hibridización se completó a 68°C por 16 horas más. Finalizado este procedimiento, las membranas fueron lavadas dos veces a temperatura ambiente con solución de lavado I (SSC 1X, SDS 1%) durante 2 minutos y dos veces a 68°C con solución de lavado II (SSC 0,2X, SDS 0,1%) durante 2 minutos.

### 11.6. Autorradiografía y cuantificación

Las membranas lavadas se secaron entre papel Whatman 3MM por 1 hora a 50°C, se envolvieron con nylon impermeable y se expusieron en un cassette con pantalla radiográfica intensificadora (Fujifilm) a temperatura ambiente entre 48 y 72 horas. Luego de escanear las pantallas en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyzer Fujifilm BAS-1800II, las imágenes resultantes se cuantificaron con el *software* ImageJ, NIH.

### 11.7. Stripping

Con el objeto de marcar nuevamente la misma membrana con una sonda diferente, esta fue lavada dos veces a temperatura ambiente con solución de *stripping* (Tris-HCl 200 mM pH 7, SSC 0,1X, SDS 0,1%) durante 15 minutos y dos veces a temperatura ambiente en agua estéril libre de RNasas durante 10 minutos. Se secó la membrana

entre papeles Whatman 3MM durante 30 minutos a temperatura ambiente y se la hibridizó con la nueva sonda de la misma forma que fue detallado inicialmente.

## 12. Análisis de ARN por RT-qPCR

### 12.1. Aislamiento del ARN total

El ARN fue aislado utilizando el reactivo TRIzol Reagent (Life Technologies) según las indicaciones del fabricante, con leves modificaciones. Se partió de  $2 \times 10^6$  células en placas de 60 mm, se cosecharon con 1 ml de PBS y centrifugaron 10 minutos a 8000 rpm a 4°C. El pellet celular fue resuspendido en 200 µl de TRIzol e incubado 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 40 µl de cloroformo, se vortexeó vigorosamente durante 15 segundos e incubó 3 minutos a temperatura ambiente. La separación de fases se logró mediante centrifugación durante 15 minutos a  $12000 \times g$  a 4°C. La fase superior acuosa se trasvasó a otro tubo y el ARN fue precipitado agregando 100 µl de isopropanol y dejándolo 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a  $12000 \times g$  a 4°C y el pellet fue lavado con 200 µl de etanol 75%. Nuevamente, se realizó una centrifugación de 5 minutos a  $7500 \times g$  a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 20 µl de agua estéril libre de RNasas. Se facilitó la resuspensión del ARN mediante una incubación en termobloque a 60°C durante 10 minutos. La concentración del ARN se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm ( $DO_{260}=1$  equivale a 40 µg/ml de ARN), aceptando como criterio de pureza  $DO_{260}/280 > 1,7$  (Sambrook 1987). El ARN obtenido fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

### 12.2. Obtención del ADNc mediante transcripción reversa o retrotranscripción

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total obtenido mediante transcripción reversa o retrotranscripción (RT) con la enzima RT M-MLV (Promega M1701). Para ello, se preparó una mezcla de reacción de acuerdo a la *Tabla I*.

La *mezcla 1* fue incubada a 65°C durante 5 minutos con el objetivo de desnaturalizar las muestras. Luego, se la dejó unos minutos en hielo, se le agregó el volumen correspondiente a la *mezcla 2* y se incubó a 37°C durante 50 minutos. La reacción se inactivó a 70°C durante 15 minutos. El ADNc obtenido fue almacenado a -20°C hasta su utilización en reacciones de PCR en tiempo real (qPCR).



Mezcla	Reactivo	Volumen
1	dNTPs 10 mM	1 µl
	OligodT 100 µM	1 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> estéril	5 µl
	ARN 500 µg/µl	2 µl
5 minutos a 65°C		
2	Buffer 5X	4 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> estéril	6 µl
	RT M-MLV 200 U/µl	1 µl
50 minutos a 37°C		
15 minutos a 70°C		

**Tabla I.** Protocolo para la retrotranscripción.

### 12.3. PCR en tiempo real o cuantitativa

El ADNc se amplificó por PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) de modo de determinar los niveles de expresión génica. Para ello, 5  $\mu$ l de una dilución 1:5 del ADNc obtenido mediante la RT, se amplificaron en una mezcla de reacción conteniendo buffer de reacción 1X, dNTPs 0,2 mM, 0,025  $\mu$ l de SYBRgreen 1:30, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 1 U de Taq ADN Polimerasa (Life Technologies) y *primers* específicos 0,1  $\mu$ M en un volumen final de 25  $\mu$ l. La reacción de qPCR se llevó a cabo en un aparato DNA Engine Opticon (MJ Research). El programa de amplificación se detalla en la *Figura III*.

5 minutos a 95°C  
 15 segundos a 95°C  
 20 segundos a  $T_{annealing}$   
 25 segundos a 72°C  
 Lectura de fluorescencia  
 Curva de melting de 65°C a 95°C cada 0,2°C

40 ciclos

**Figura III.** Esquema del protocolo de amplificación por qPCR.

Las secuencias de los *primers* específicos para cada uno de los genes analizados se detallan en la *Tabla II*.

Gen	Primer forward	Primer reverse	$T_{annealing}$
<b>BRCA1(h)</b>	5'TGAAATCAGTTTGGATTCTGC3'	5'CATGCAAGTTTGAAACAGAAC3'	58,2°C
<b>p53(h)</b>	5'CCAGGGAGCACTAAGCGAGCAC3'	5'GAACATCTCGAAGCGCTCACGC3'	59,2°C
<b>GAPDH(h)</b>	5'TCTCTGCTCCTCCTGTTC3'	5'GCCCAATACGACCAAATCC3'	Ídem gen interés

**Tabla II.** Secuencia de los *primers* para amplificar ADNc por qPCR. (h), gen humano.

Cada reacción de PCR se realizó por duplicado. Los datos obtenidos se analizaron con el *software* Opticon 3 trazando una recta en la parte exponencial de la curva de amplificación, obteniendo así los valores  $C_T$ . El cálculo de la inducción de la expresión

de los genes de interés se llevó a cabo a partir de una cuantificación relativa según el método del  $\Delta\Delta C_T$  (Livak and Schmittgen 2001), aplicando las fórmulas (3) a (5). Dicho método asume que las eficiencias de amplificación del gen de interés y del gen de referencia son equivalentes. En primer lugar, se calculó el promedio de los valores  $C_T$  obtenidos por duplicado para cada reacción de acuerdo a la fórmula (3). Luego, se determinó el valor  $\Delta C_T$  según la fórmula (4), donde el gen de referencia fue GAPDH. Finalmente, considerando el exponente natural de la qPCR, los valores fueron transformados en medidas relativas de veces de enriquecimiento (VE) para una mejor comparación entre los experimentos, aplicando la fórmula (5).

$$(3) \overline{C_T} = \frac{(C_{T1} + C_{T2})}{2}$$

$$(4) \Delta C_T = \overline{C_T}_{\text{gen interés}} - \overline{C_T}_{\text{gen referencia}}$$

$$(5) VE = 2^{-\Delta C_T}$$

### 13. Análisis de proteínas por Western Blot

#### 13.1. Preparación del lisado celular total

Se partió de  $1,5 \times 10^6$  células sembradas en placas de 60 mm, las cuales se lavaron una vez con PBS, cosecharon con 1 ml de PBS y centrifugaron 10 minutos a 8000 rpm a 4°C. El pellet celular fue resuspendido en 60  $\mu$ l de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,25%, EDTA 1 mM pH 8) conteniendo inhibidores de proteasas 1X (Calbiochem 539134), y se lo incubó 30 minutos en hielo. Transcurrido dicho tiempo, se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm a 4°C y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo eppendorf. Los niveles de proteínas totales se cuantificaron mediante el método de ácido bicinconínico según se detalla más adelante. Para cada muestra, una masa de 20-50  $\mu$ g de proteína fue utilizada para la electroforesis en gel de poliacrilamida, adicionándole buffer Laemmli 2X (Tris-HCl 0,16 M pH 6,8, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,3%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,7 M) o bien buffer Laemmli 5X (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol 25%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,7 M) dependiendo de cuán concentrada estuvieran las proteínas en el buffer RIPA (Laemmli 1970). Las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su utilización.

### 13.2. Método de ácido bicinconínico

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de ácido bicinconínico (BCA, Sigma-Aldrich B9643). Para ello, en una placa de 96 pocillos conteniendo 200 µl de una mezcla BCA-CuSO<sub>4</sub> 4% (50:1) se sembraron 5 µl de las muestras y una curva de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA). La placa fue incubada a 37°C durante 20 minutos y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Bio-Rad iMark. Se construyó una curva de *absorbancia vs concentración* con las lecturas de los estándares, y a partir de la misma se determinaron las concentraciones de las muestras.

### 13.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

En todos los casos las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemmli 1970). Utilizamos el sistema vertical de Bio-Rad. Según el peso molecular de la proteína a resolver, se prepararon geles separadores conteniendo diferentes porcentajes de acrilamida-bisacrilamida:

- Proteínas con tamaño menor a 35 KDa: gel 15% (1,1 ml de agua destilada, 2,5 ml de solución de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%, 1,3 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 µl de SDS 10%, 20 µl de persulfato de amonio 25% y 2 µl de TEMED para 5 ml de solución).
- Proteínas con tamaño entre 35 KDa y 130 KDa: gel 12% (1,6 ml de agua destilada, 2 ml de solución de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%, 1,3 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 µl de SDS 10%, 20 µl de persulfato de amonio 25% y 2 µl de TEMED para 5 ml de solución) o gel 10% (1,9 ml de agua destilada, 1,7 ml de solución de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%, 1,3 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 µl de SDS 10%, 20 µl de persulfato de amonio 25% y 2 µl de TEMED para 5 ml de solución).

El gel concentrador se preparó, en todos los casos, al 4% (2,17 ml de agua destilada, 0,4 ml de solución de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%, 375 µl de Tris-HCl 1 M pH 6,8, 30 µl de SDS 10%, 12 µl de persulfato de amonio 25% y 3 µl de TEMED para 3 ml de solución). Previo a la siembra, las muestras se hirvieron durante 5 minutos con el objeto de desnaturalizar las proteínas y romper los puentes disulfuro intercatenarios. En paralelo, se sembró en un pocillo 1-2 µl del marcador de peso molecular (PageRuler

Prestained Protein Ladder, Fermentas SM0671). La electroforesis se realizó a 120 V en buffer de corrida (Tris base 25 mM, glicina 0,19 M, SDS 1%).

#### **13.4. *Transferencia a la membrana***

Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Burnette 1981). Una de las caras del gel fue apoyada sobre un trozo de membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, GE Healthcare) del mismo tamaño. Ambos fueron colocados entre papeles Whatman 3MM previamente humedecidos en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 0,19 M, SDS 0,01%, metanol 20%) y, a su vez, situados entre dos esponjas de poro grande dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en una cuba electroforética, con buffer de transferencia, colocando la membrana de nitrocelulosa del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 200 mA durante 60 minutos. Para determinar la eficiencia de la transferencia, la membrana se incubó en una solución de Rojo Ponceau S 0,1% en ácido acético glacial 5% durante 2-3 minutos. El exceso de colorante de la membrana fue eliminado mediante sucesivos lavados con agua destilada.

#### **13.5. *Detección de proteínas***

Luego de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue colocada en solución de bloqueo [leche descremada en polvo 5% en buffer TPBS (Tween-20 0,05% en PBS)] y se la dejó en agitación suave 30 minutos a temperatura ambiente para reducir los sitios potenciales de unión a proteínas inespecíficas. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en TPBS durante toda la noche a 4°C con agitación suave y constante. La membrana se lavó una vez con TPBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rabanito (HRP) diluido en TPBS durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. La membrana se lavó nuevamente una vez con TPBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para visualizar las proteínas de interés, se utilizó ECL no comercial mezclando 1 ml de reactivo A (luminol 2,54 mM, ácido p-cumárico 0,4 mM, en Tris-HCl 0,1 M pH 8), 1 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 8 y 2 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volúmenes. Dicha detección está basada en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión del sustrato de la enzima HRP. La señal fue detectada en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyzer Fujifilm LAS-1000, y posteriormente cuantificada con el *software* ImageJ, NIH.

Dado que el gen de la  $\beta$ -actina presenta expresión constitutiva, los resultados de los ensayos de Western Blot fueron normalizados a los valores de los niveles proteicos de  $\beta$ -actina detectados en paralelo.

Anticuerpos primarios utilizados:

- E2F1 monoclonal (*mouse*), Santa Cruz Biotechnology sc-251, dilución 1:100
- E2F2 monoclonal (*mouse*), Santa Cruz Biotechnology sc-9967, dilución 1:100
- E2F4 policlonal (*rabbit*), Santa Cruz Biotechnology sc-866, dilución 1:200
- GFP policlonal (*rabbit*), cedido gentilmente por el Dr. Martín Monte de la Universidad de Buenos Aires, dilución 1:2000
- Caspasa-3 clivada monoclonal (*rabbit*), Cell Signaling 9664, dilución 1:1000
- $\beta$ -actina monoclonal (*mouse*), Santa Cruz Biotechnology sc-47778, dilución 1:3000
- GAPDH monoclonal (*mouse*), Santa Cruz Biotechnology sc-32233, dilución 1:1000
- Histona H3 policlonal (*rabbit*), Santa Cruz Biotechnology sc-8654-R, dilución 1:1000
- Histona H2A.X Ser139 monoclonal (*mouse*), Upstate 05-636, dilución 1:1000
- Rad51 policlonal (*rabbit*), Santa Cruz Biotechnology sc-8349, dilución 1:1000
- GCN5 policlonal (*rabbit*), Santa Cruz Biotechnology sc-20698, dilución 1:1000

Anticuerpos secundarios utilizados:

- Goat anti-*mouse* conjugado con HRP, Sigma-Aldrich A4416, dilución 1:3000
- Goat anti-*rabbit* conjugado con HRP, Sigma-Aldrich A6154, dilución 1:3000

#### 14. Co-inmunoprecipitación

Se partió de células SH-SY5Y crecidas en placas de 150 mm al 80% de confluencia, las cuales fueron cosechadas a los tiempos indicados luego del tratamiento genotóxico por centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet celular fue resuspendido en 500  $\mu$ l de buffer RIPA conteniendo inhibidores de proteasas 1X (Calbiochem 539134), y se lo incubó 30 minutos en hielo. Transcurrido dicho tiempo, se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm a 4°C y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo eppendorf. Los niveles de proteínas totales se cuantificaron mediante el método de ácido bicinonínico descrito anteriormente. Para cada inmunoprecipitación, se diluyó el volumen correspondiente a 1 mg de proteína a un volumen final de 1 ml con buffer RIPA, y se lo incubó con 1  $\mu$ g de anticuerpo monoclonal (*mouse*) anti-E2F1 (Santa Cruz Biotechnology sc-251), 1  $\mu$ g de anticuerpo monoclonal (*mouse*) anti-E2F2 (Santa Cruz

Biotechnology sc-9967) o 1 µg de anticuerpo E2F4 policlonal (*rabbit*) anti-E2F4 (Santa Cruz Biotechnology sc-866), junto con 20 µl de *beads* de agarosa proteína A/G PLUS (Santa Cruz Biotechnology sc-2003) durante 16 horas a 4°C en rotación suave y constante. El anticuerpo IgG (*mouse*, Santa Cruz Biotechnology sc-2025) fue utilizado como control de isotipo. Las *beads* fueron sometidas a tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno en rotación a temperatura ambiente. Luego se les agregó 20 µl de buffer Laemmli 2X y las proteínas asociadas fueron analizadas por Western Blot, según el protocolo descripto.

### 15. Fraccionamiento subcelular y extracción de la cromatina

El fraccionamiento y aislamiento de la cromatina fue llevado a cabo como fue descripto por Mendez y Stillman (Mendez and Stillman 2000), con leves modificaciones. Células SH-SY5Y sembradas en placas de 100 mm de diámetro, fueron cosechadas y cuantificadas. El volumen de la suspensión celular correspondiente a  $1 \times 10^7$  células fue centrifugado 10 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente. El pellet celular fue resuspendido en 300 µl de buffer A (HEPES 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, sacarosa 340 mM, glicerol 10%, DTT 1mM) suplementado con Tritón X-100 0,1% e inhibidores de proteasas 1X (Calbiochem 539134), e incubado durante 5 minutos en hielo. Los núcleos fueron recolectados en el pellet luego de centrifugar las muestras a baja velocidad (4 minutos a  $1300 \times g$  a 4°C). El sobrenadante obtenido fue centrifugado a alta velocidad (15 minutos a  $16000 \times g$  a 4°C) para eliminar agregados insolubles y debris celulares, obteniendo así la fracción citoplasmática en el sobrenadante. La fracción nuclear previamente recolectada fue lavada una vez con 300 µl de buffer A y resuspendida en 200 µl de buffer B (EDTA 3 mM pH 8, EGTA 0,2 mM, DTT 1 mM) conteniendo inhibidores de proteasas 1X (Calbiochem 539134) e incubada durante 30 minutos en hielo. Se centrifugó a baja velocidad (5 minutos a  $1700 \times g$  a 4°C) y el pellet resultante fue lavado una vez con 200 µl de buffer B y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. El pellet obtenido, correspondiente a la fracción cromatínica, fue resuspendido en 200 µl de buffer Laemmli 2X y sonicado dos veces en un sonicador Fisher Sonic Dismembrator Model 300 durante 15 segundos al 50% de potencia, alternando con 15 segundos de reposo en hielo cada vez. Las fracciones citoplasmática y cromatínica, que fueron guardadas a -20°C hasta su utilización, fueron posteriormente analizadas mediante ensayos de Western Blot según el protocolo previamente detallado.

## 16. Fraccionamiento subcelular con Tritón X-100

El fraccionamiento con Tritón X-100 para el análisis de la redistribución de Rad51 fue realizado según fue descrito anteriormente (Gospodinov, Tsaneva et al. 2009), levemente modificado. Células SH-SY5Y sembradas en placas de 60 mm de diámetro al 80% de confluencia, fueron transfectadas con los ODNs indicados de la manera mencionada anteriormente. Transcurridas 18 horas post-transfección, se procedió a irradiar las células con luz UV y se las cosechó 30 minutos después mediante centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet celular fue resuspendido en 200 µl de buffer CSK (HEPES 10 mM pH 6,8, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, sacarosa 300 mM, EGTA 1mM, Tritón X-100 0,5%) suplementado con inhibidores de proteasas 1X (Calbiochem 539134), e incubado durante 10 minutos en hielo. Las células fueron centrifugadas a baja velocidad (5 minutos a 500 x g a 4°C), obteniendo las fracciones soluble e insoluble en Tritón X-100 correspondientes al sobrenadante y pellet respectivamente. La fracción soluble fue clarificada mediante una centrifugación adicional a alta velocidad (10 minutos a 15000 x g a 4°C). La fracción insoluble fue lavada con 200 µl de buffer A (NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, sacarosa 250 mM, EGTA 1mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,6) conteniendo inhibidores de proteasas 1X (Calbiochem 539134), resuspendida en 200 µl de buffer Laemmli 2X y sonicada dos veces en un sonicador Fisher Sonic Dismembrator Model 300 durante 15 segundos al 50% de potencia, alternando con 15 segundos de reposo en hielo cada vez. Cantidades equivalentes de proteínas de las fracciones soluble citoplasmática e insoluble cromatínica fueron posteriormente analizadas mediante ensayos de Western Blot según el protocolo detallado anteriormente.

## 17. Inmunoprecipitación de la cromatina

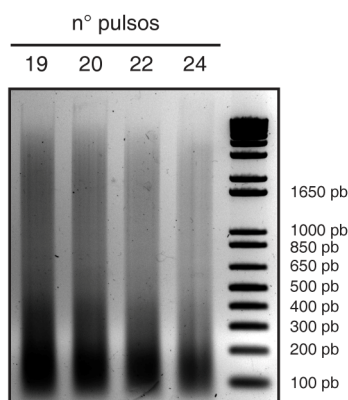
### 17.1. Cross-linking

Por cada condición analizada, se utilizaron tres placas de 150 mm sembradas con células SH-SY5Y al 85% de confluencia. El *cross-linking* e inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se realizaron 30 minutos luego de la irradiación UV a placa abierta. Las células fueron lavadas una vez con PBS y fijadas con formaldehído 1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fijación fue interrumpida con el agregado de glicina a una concentración final de 0,125 M e incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas dos veces con PBS,

cosechadas y centrifugadas 10 minutos a 8000 rpm a 4°C. El pellet celular correspondiente a cada placa de 150 mm se resuspendió en 1 ml de buffer 1 (Hepes-KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM pH 8, glicerol 10%, NP-40 0,5%, Tritón X-100 0,25%), y se lo dejó durante 10 minutos a 4°C en rotación suave y constante. Luego de una centrifugación de 5 minutos a 1000 rpm a 4°C, el pellet fue resuspendido en 1 ml de buffer 2 (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM pH 8, EGTA 0,5 mM pH 8), dejándolo en rotación suave y constante durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, luego de una nueva centrifugación de 5 minutos a 1000 rpm a 4°C, el pellet se resuspendió en 1,3 ml de buffer 3 (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM pH 8, SDS 0,1%, NP-40 0,95%, deoxicolato de sodio 0,1%). En todos los casos, a los buffers 1, 2 y 3 se les añadió inhibidores de proteasas 1X (Calbiochem 539134). Los lisados fueron trasvasados a tubos falcon de 15 ml de poliestireno, y se los sonicó en un sonicador Bioruptor (Diagenode) por veinte pulsos de 30 segundos *high*, alternando con 30 segundos de reposo, con el fin de obtener fragmentos de cromatina con un tamaño de aproximadamente 200 pb. Los lisados sonicados fueron centrifugados 10 minutos a 14000 rpm a 4°C, obteniendo la cromatina en el sobrenadante.

### 17.2. Chequeo de la sonicación de la cromatina

El tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por sonicación se chequeó por electroforesis en geles de agarosa 1%. Para ello, 20 µl de cromatina fueron sometidos a reversión de *cross-linking* y extracción del ADN, como se detalla más adelante. Las muestras fueron sembradas con buffer de siembra 6X en un gel de agarosa 1% conteniendo bromuro de etidio 0,5 µg/ml, y resueltas por electroforesis a voltaje constante (5 V/cm) en buffer TBE 1X. La corrida se visualizó con el analizador de imágenes GBox SYNGENE utilizando el *software* GeneSys (Figura IV).



**Figura IV.** Gel de agarosa 1% representativo de la puesta a punto de la sonicación con el Sonicador Bioruptor (Diagenode) para la realización del ChIP. Se muestra la cromatina obtenida al sonicar 19, 20, 22 o 24 pulsos de 30 segundos *high*.



### 17.3. Inmunoprecipitación

Los niveles de proteínas totales de los lisados sonicados para cada condición se cuantificaron mediante el método de ácido bicinonínico, detallado previamente. Para realizar el ChIP, un volumen de lisado correspondiente a una masa de 1 mg fue preclareado con 20 µl de *beads* de agarosa proteína A/G PLUS (Santa Cruz Biotechnology sc-2003) durante 2 horas a 4°C en rotación suave y constante. Luego de remover las *beads* con una centrifugación suave de 10 minutos a 1000 rpm a 4°C, el sobrenadante se incubó con 1 µg de anticuerpo monoclonal (*mouse*) anti-E2F1 (Santa Cruz Biotechnology sc-251) o con 1 µg de anticuerpo monoclonal (*mouse*) anti-E2F2 (Santa Cruz Biotechnology sc-9967) durante 2 horas a 4°C en rotación suave y constante. También se incubó con 1 µg de anticuerpo IgG (*mouse*, Santa Cruz Biotechnology sc-2025), el cual fue utilizado como control de especificidad; o bien con 1 µg de anticuerpo policlonal (*rabbit*) anti-ARN Polimerasa II (Santa Cruz Biotechnology sc-899), empleado como control positivo de inmunoprecipitación. Transcurridas las 2 horas, se añadieron 20 µl de *beads* de agarosa proteína A/G PLUS (Santa Cruz Biotechnology sc-2003), y se dejó en rotación suave y constante durante 16 horas a 4°C. Las *beads* fueron luego sometidas a cuatro lavados de 5 minutos cada uno en rotación a temperatura ambiente, con 1 ml de los sucesivos buffers: *low salt buffer* (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM pH 8, Tritón X-100 1%, SDS 0,1%), *high salt buffer* (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, EDTA 2 mM pH 8, Tritón X-100 1%, SDS 0,1%), *lithium buffer* (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, LiCl 250 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 1%) y buffer TE+NaCl (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, NaCl 50 mM). Entre cada lavado, se realizó una centrifugación de 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente para remover el buffer de lavado. La elución se llevó a cabo al incubar las *beads* en termobloque a 65°C durante 10 minutos con 150 µl de buffer de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8, SDS 1%, EDTA 1 mM pH 8), seguido de centrifugación a 2400 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente.

### 17.4. Reversión del cross-linking y extracción del ADN

La reversión del *cross-linking* se realizó incubando los 150 µl del eluido obtenido con 6 µl de NaCl 5 M en termobloque a 65°C durante 16 horas. De la misma manera, se revirtió el *cross-linking* del input –correspondiente al 10% del volumen de lisado

utilizado para el ChIP- o del lisado para el chequeo de la sonicada, al llevarlo a un volumen final de 300 µl con buffer de elución e incubarlo 16 horas a 65°C con 12 µl de NaCl 5 M. Al día siguiente, se incubaron las muestras 1 hora a 45°C con 5 µl de proteinasa K 10 mg/ml (Sigma-Aldrich P2308) y luego se procedió a la extracción del ADN con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico. Para ello, se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por inversión ocho veces, y la separación de fases se logró mediante centrifugación durante 8 minutos a 4500 rpm a temperatura ambiente. La fase superior acuosa se trasvasó a otro tubo y el ADN fue precipitado agregando 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2, 2 volúmenes de etanol absoluto y 20 µg de glucógeno, y dejándolo a -20°C hasta el día siguiente. Luego, se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente, y el pellet fue lavado con 500 µl de etanol 70%. Nuevamente, se realizó una centrifugación de 5 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

### 17.5. Amplificación del ADN obtenido por ChIP

La amplificación del ADN obtenido por ChIP se realizó por qPCR. Para ello, 5 µl de del ADN obtenido para cada inmunoprecipitación o bien una dilución 1:10 del ADN del input, se amplificaron en una mezcla de reacción conteniendo buffer de reacción 1X, dNTPs 0,2 mM, 0,025 µl de SYBRgreen 1:30, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 1 U de Taq ADN Polimerasa (Life Technologies) y *primers* específicos 0,1 µM en un volumen final de 25 µl. La reacción de qPCR se llevó a cabo en un aparato DNA Engine Opticon (MJ Research). El programa de amplificación corresponde a aquel descrito en la *Figura III*. Las secuencias de los *primers* específicos para cada uno de los genes analizados se detallan en la *Tabla III*.

Gen	Primer forward	Primer reverse	T <sub>annealing</sub>
<b>BRCA1(h)</b>	5'CGACTGCTTTGGACAATAGGTAGCG3'	5'AGTCTGCCCCCGGATGACGTAA3'	58°C
<b>p53(h)</b>	5'CCAGCTGAGAGCAAACGCAAAAGC3'	5'CTCGCCGACCTGGTGCCGTA3'	60°C
<b>Control Negativo(h)</b>	5'ATGGTTGCCACTGGGGATCT3'	5'TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA3'	60°C

**Tabla III.** Secuencia de los *primers* para amplificar ADN obtenido por ChIP por qPCR.

(h), gen humano. La secuencia del Control Negativo fue tomada del Kit ChIP-IT (Active Motif).

Cada reacción de PCR se realizó por duplicado. Los datos obtenidos se analizaron con el *software* Opticon 3 trazando una recta en la parte exponencial de la curva de

amplificación, obteniendo así los valores  $C_T$ . El análisis de datos se realizó mediante el método del porcentaje de input, el cual tiene en cuenta la variabilidad dada por la cantidad de cromatina utilizada y la eficiencia de la inmunoprecipitación. En primer lugar, se calculó el promedio de los valores  $C_T$  obtenidos por duplicado para cada reacción de acuerdo a la fórmula (3). Luego, se determinó el valor del input ajustado al 100% según la fórmula (6), considerando que se amplificó un 1% del input. Finalmente, se determinó el % input para cada muestra aplicando la fórmula (7).

$$(6) C_T \text{ input ajustado al } 100\% = \overline{C_T \text{ input}} - \log_2 100$$

$$(7) \% \text{ Input} = 100 \times 2^{C_T \text{ input ajustado al } 100\% - \overline{C_T \text{ muestra}}}$$

## 18. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Se partió de  $1 \times 10^6$  células Neuro-2a sembradas en placas de 60 mm. Las mismas fueron transfectadas con los ODNs señalados de la manera previamente detallada. Transcurridas 18 horas post-transfección, se procedió a realizar los tratamientos genotóxicos correspondientes. Las células fueron cosechadas 24 horas luego del daño con PBS y centrifugadas 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente. Al pellet se lo resuspendió en 1 ml de etanol 70% y se lo conservó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su marcación. Las células fijadas fueron lavadas una vez con PBS, centrifugadas 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente y resuspendidas en 500  $\mu\text{l}$  de una mezcla compuesta de yoduro de propidio 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma-Aldrich P4170) y RNasa A 0,1  $\text{mg}/\text{ml}$  (Sigma-Aldrich R6513) en PBS. El contenido de ADN celular fue analizado en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, California, Estados Unidos) y los datos se procesaron con los *softwares* Cylchred y WinMDI 2.9.

## 19. Determinación de la actividad transactivadora del factor E2F

Los plásmidos reporteros utilizados en este ensayo fueron pE2F-CAT y p $\Delta$ E2F-CAT, descriptos anteriormente.

### 19.1. Transfección de células en cultivo

Células Neuro-2a sembradas en placas de 6 pocillos a razón de  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo fueron transfectadas con 2  $\mu\text{g}$  del plásmido pE2F-CAT o p $\Delta$ E2F-CAT, 2  $\mu\text{g}$  del plásmido pCEFL- $\beta$ -galactosidasa y, según sea el ensayo correspondiente, con los ODNs indicados de la manera detallada anteriormente. Las células transfectadas

fueron mantenidas 18 horas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%. Al cabo de tal período, se las sometió a los tratamientos genotóxicos pertinentes. Cabe señalar que el medio con la mezcla de transfección no fue reemplazado por medio fresco al dañar; sino que se adicionaron en el mismo la neocarzinostatina o peróxido de hidrógeno, y en el caso de la irradiación UV, dicho medio fue removido y readicionado posteriormente de modo de llevar a cabo la irradiación a placa abierta. Las células fueron cosechadas 24 horas post-daño para la preparación de los extractos celulares.

### **19.2. Preparación de extractos celulares**

Las células fueron lavadas una vez con PBS frío. Posteriormente, se agregaron 700 µl de Buffer TEN (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, NaCl 100 mM) frío para favorecer el despegado de las células. Luego de cosecharlas, las mismas fueron centrifugadas 10 minutos a 5000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet celular resuspendido en 200 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 250 mM pH 7,5, glicerol 15%). Las células fueron lisadas sometiéndolas a 5 ciclos consecutivos de congelamiento-descongelamiento en nitrógeno líquido y baño de agua a 37°C respectivamente. Finalmente, los tubos se centrifugaron 10 minutos a 10000 rpm a 4°C para eliminar el debris celular. El sobrenadante obtenido se dividió en dos alícuotas de 100 µl cada una, para la posterior determinación de actividad cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y actividad β-galactosidasa.

### **19.3. Determinación de la actividad cloranfenicol acetiltransferasa**

La actividad de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) fue determinada según el método descrito por Seed y Sheen (Seed and Sheen 1988). El extracto celular fue calentado a 65°C durante 5 minutos con el propósito de inactivar las deacetilasas endógenas. Se enfrió inmediatamente en hielo durante 5 minutos y se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm a 4°C para eliminar las proteínas desnaturalizadas. La actividad CAT fue determinada en 50 µl del sobrenadante junto con 20 µl de Tris-HCl 0,5 M pH 8, 10 µl de butiril-CoA 2,5 mg/ml (Sigma-Aldrich B1508) y 20 µl de <sup>3</sup>H-cloranfenicol 200 mCi (60 Ci/mmol, 0,01 mCi/ml). Dicha mezcla fue incubada 2 horas en baño a 37°C. La reacción fue detenida por el agregado de 200 µl de xileno. Luego de vortexear vigorosamente, los incubados fueron centrifugados 15 minutos a 15000 rpm a 4°C. Se separó la fase orgánica, la cual fue sometida a una extracción reversa mediante el agregado de 200 µl de H<sub>2</sub>O. Tras vortexear y centrifugar bajo las

mismas condiciones, 150 µl de la fase orgánica resultante –que contiene los derivados butirilados de <sup>3</sup>H-cloranfenicol–, fueron colocados en viales con líquido centellante a base de tolueno y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. La actividad específica de CAT se determinó según la fórmula (8). Las unidades CAT fueron normalizadas con las unidades β-galactosidasa de modo de ajustar los resultados a la eficiencia de transfección en cada caso.

$$(8) \text{ As CAT} = \frac{\text{dpm muestra} - \text{dpm blanco}}{\mu\text{l} \times \text{minuto}}$$

#### 19.4. Determinación de la actividad β-galactosidasa

La actividad de la enzima β-galactosidasa se determinó mediante un ensayo colorimétrico en el cual se cuantifica el sustrato cromogénico liberado por hidrólisis. La reacción se llevó a cabo en una mezcla conteniendo 50 µl del extracto, 1 ml de buffer PM2 (buffer fosfato 0,1 M pH 7,0, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM), 1 mg del sustrato ortonitrofenil-β-galactopiranosido (ONPG) y 1 µl de β-mercaptoetanol. La reacción se desarrolló a 37°C hasta la aparición de color amarillo, aproximadamente luego de 4-6 horas. Se registró el tiempo de reacción y se midió la absorbancia a 420 nm. La actividad específica de la enzima β-galactosidasa fue calculada aplicando la fórmula (9).

$$(9) \text{ As } \beta - \text{Galactosidasa} = \frac{A_{420} \text{ muestra} - A_{420} \text{ blanco}}{\mu\text{l} \times \text{hora}}$$

## 20. Inmunofluorescencia

Células SH-SY5Y o Neuro-2a fueron sembradas al 50% de confluencia sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro colocados en placas de 24 pocillos o sobre cubreobjetos cuadrados de 18 mm/lado colocados en placas de 6 pocillos respectivamente, y dejadas en reposo 24 horas para permitir su adherencia. Al día siguiente fueron transfectadas con los plásmidos u ODNs indicados de la manera detallada anteriormente. Transcurridas 18 horas post-transfección, se procedió a realizar los tratamientos genotóxicos correspondientes y en los tiempos indicados las células fueron lavadas una vez con PBS y fijadas con paraformaldehído 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar dos veces con PBS, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,1% por 10 minutos, lavadas nuevamente dos veces con PBS e incubadas 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo

(BSA 2% en PBS). A continuación, fueron lavadas dos veces con PBS e incubadas hasta el día siguiente en cámara húmeda a 4°C con una dilución 1:500 del anticuerpo primario monoclonal (*mouse*) anti-Histona H2A.X Ser139 (Upstate 05-636) y/o con una dilución 1:1000 del anticuerpo primario policlonal (*rabbit*) anti-Rad51 (Calbiochem PC130) en solución de bloqueo. Las células fueron lavadas una vez con PBS y una vez con Tritón X-100 0,1% en PBS, previo a incubarlas durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad con una dilución 1:2000 del anticuerpo secundario anti-IgG *mouse* conjugado a Alexa Fluor 555 (Life Technologies) y/o con una dilución 1:2000 del anticuerpo secundario anti-IgG *rabbit* conjugado a Alexa Fluor 488 (Life Technologies) en solución de bloqueo. Posteriormente, se las lavó dos veces con Tritón X-100 0,1% en PBS, los núcleos fueron teñidos con DAPI (1 µg/µl final en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y, finalmente, las células fueron montadas con medio de montaje de fluorescencia (Dako S3023). Los preparados fueron observados con un microscopio confocal Leica SPE; o bien con un microscopio Eclipse E600W Nikon, cuya adquisición de imágenes se realizó con una cámara digital Coolpix 5000 Nikon. Las determinaciones de intensidades de γH2AX o de número de *foci* de Rad51 fueron llevadas a cabo mediante el uso del *software* CellProfiler.

## 21. Ensayo de reparación del ADN - Slot Blot

Células SH-SY5Y sembradas en placas de 6 pocillos a razón de  $2 \times 10^5$  células/pocillo fueron transfectadas con los ODNs indicados de la manera detallada anteriormente. Las células transfectadas fueron mantenidas 18 horas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%. Transcurrido dicho período, las células fueron irradiadas a placa abierta con UV, se les adicionó medio fresco y fueron cosechadas a los tiempos indicados post-daño con PBS y centrifugadas 10 minutos a 8000 rpm a 4°C. El pellet celular se resuspendió en 300 µl de buffer de digestión (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 25 mM pH 8, SDS 0,5%) suplementado con 0,1 mg/ml proteinasa K (Sigma-Aldrich P2308), y se incubó en baño a 50°C durante 18 horas. A continuación, se realizó la extracción del ADN genómico total con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), descrita previamente (ver 17.4. *Inmunoprecipitación de la cromatina – Reversión del cross-linking y extracción del ADN*). Masas equivalentes del ADN extraído (200 ng) fueron sembradas en una membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, GE Healthcare) previamente humedecida en SSC 6X, mediante un aparato de Slot Blot (Life Technologies). Se desnaturalizó el ADN al incubar la membrana con una solución de NaOH 0,4 M durante 20 minutos a

temperatura ambiente, y luego la misma se colocó entre papeles Whatman 3MM en estufa a 80°C durante 2 horas para la fijación irreversible del ADN al nylon. Las lesiones al ADN inducidas por UV fueron detectadas por Western Blot con una dilución 1:500 del anticuerpo primario monoclonal (*mouse*) anti-CPD (Kamiya Biomedical MC-062) en TPBS. Como control de carga, la membrana fue posteriormente teñida con una solución de azul de metileno 0,04% en acetato de sodio 0,5 M pH 5,2 durante 10 minutos a temperatura ambiente.

## 22. Ensayo de actividad de la enzima caspasa-3

Para evaluar el nivel de apoptosis en las células luego del tratamiento genotóxico se determinó la actividad de la enzima caspasa-3. El ensayo fue realizado como fue descrito previamente (Chen, Shen et al. 2005), con algunas modificaciones. Se partió de  $5 \times 10^5$  células SH-SY5Y sembradas en placas de 35 mm, las cuales fueron transfectadas con los ODNs señalados de la forma detallada anteriormente. Transcurridas 18 horas post-transfección, se procedió a realizar los tratamientos genotóxicos correspondientes. Las células fueron cosechadas 24 horas luego del daño, lavadas una vez con PBS y resuspendidas en 250  $\mu$ l de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM pH 8, EGTA 10 mM, digitonina 10  $\mu$ M, PMSF 0,5 mM) e incubadas 1 hora a 37°C vortexeando cada 15 minutos. Luego se las centrifugó 15 minutos a  $10000 \times g$  a 4°C, y el sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta su utilización. La actividad de la enzima caspasa-3 fue determinada con 150  $\mu$ l del lisado celular en 150  $\mu$ l de buffer de reacción (HEPES 100 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM pH 8, ditiotreitól 5 mM y glicerol 20%) bajo la presencia del sustrato sintético Ac-DEVD-pNA 150  $\mu$ M (Sigma-Aldrich A2559). Dicha mezcla fue incubada a 37°C por 10 horas. La aparición de color amarillo, indicativo de la actividad de caspasa-3, fue cuantificada en un lector de placas Bio-Rad iMark a 405 nm. La actividad de caspasa-3 fue estimada aplicando la fórmula (10).

$$(10) A_{\text{caspasa-3}} = \frac{A_{405}}{\mu\text{g proteína} \times \text{hora}}$$

## 23. Ensayo de MTT

La supervivencia celular fue estimada con el ensayo de bromuro de 3-[4,5 dimetiltiliazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Células SH-SY5Y fueron sembradas en placas de 48 pocillos a razón de  $1,5 \times 10^4$  células/pocillo y transfectadas con los ODNs

indicados de la manera mencionada anteriormente. Transcurridas 18 horas post-transfección, se procedió a irradiar las células con luz UV y se las incubó en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% durante los tiempos señalados. La supervivencia celular fue evaluada reemplazando el medio de cultivo con 200 µl de medio fresco conteniendo MTT 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich M2128) e incubando las células 4 horas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%. El medio con MTT fue removido y se agregaron 200 µl de isopropanol-HCl 0,1 N de modo de disolver el precipitado de MTT reducido. Las placas fueron agitadas suavemente durante 5 minutos y la absorbancia en el solvente fue determinada en un lector de placas Bio-Rad iMark a 570 nm con una longitud de referencia a 655 nm.

## 24. Ensayo clonogénico

Para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo clonogénico, células SH-SY5Y fueron sembradas diluidas en placas de 24 pocillos de modo que quedaran aisladas (aproximadamente 100-150 células/pocillo). Fueron transfectadas con los ODNs indicados de la forma detallada anteriormente y, transcurridas 18 horas post-transfección, se llevaron a cabo los tratamientos con agentes genotóxicos. Vale señalar que en este ensayo la concentración final de NCS fue 5 ng/ml, es decir, diez veces inferior a la utilizada usualmente debido a la sensibilidad que muestran las células diluidas a este genotóxico. Las células fueron incubadas con medio fresco en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% durante 10 días. Al cabo de dicho período, las mismas fueron fijadas con formaldehído 10% y teñidas con el colorante cristal violeta (5 mg/ml en etanol absoluto) para poder cuantificar la cantidad de clones viables. Las colonias que contenían más de 50 células fueron consideradas como derivadas de células clonogénicamente activas.

## 25. Inmunoprecipitación de la cromatina y Slot Blot

### 25.1. *Cross-linking*

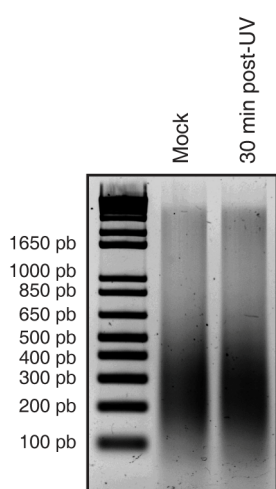
Por cada condición analizada, se utilizaron dos placas de 100 mm con 3,5x10<sup>6</sup> células SH-SY5Y cada una. Se las transfectó con los plásmidos E2F1-HA, E2F2-HA o JNK-HA de la forma detallada anteriormente y, transcurridas 18 horas post-transfección, se llevó a cabo la irradiación a placa abierta con UV. El *cross-linking* y ChIP se realizaron 30 minutos luego del daño, como fue descripto por Fousteri y Vermeulen (Fousteri,



Vermeulen et al. 2006), con leves modificaciones. Las células fueron lavadas una vez con PBS y fijadas con formaldehído 1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fijación fue interrumpida con el agregado de glicina a una concentración final de 0,125 M e incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas dos veces con PBS, cosechadas y centrifugadas 10 minutos a 8000 rpm a 4°C. El pellet celular se resuspendió en 300 µl de buffer RIPA de ChIP (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM pH 8, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%) conteniendo inhibidores de proteasas 1X (Calbiochem 539134), y se lo incubó 20 minutos en hielo. Los lisados fueron sonicados doce veces en un sonicador Fisher Sonic Dismembrator Model 300 durante 15 segundos al 50% de potencia, alternando con 15 segundos de reposo en hielo cada vez, de modo de obtener fragmentos de cromatina con un tamaño entre 200-300 pb. Los lisados sonicados fueron centrifugados 10 minutos a 13000 rpm a 4°C, obteniendo la cromatina en el sobrenadante.

### 25.2. Chequeo de la sonicación de la cromatina

El tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por sonicación se chequeó por electroforesis en geles de agarosa 1%. Para ello, se siguieron los pasos previamente mencionados (ver 17.2. *Inmunoprecipitación de la cromatina – Chequeo de la sonicación de la cromatina*). La corrida se visualizó con el analizador de imágenes GBox SYNGENE utilizando el software GeneSys (Figura V).



**Figura V.** Gel de agarosa 1% representativo del tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por sonicación para la realización del ChIP. Se muestra la cromatina sonicada obtenida para las células cosechadas 30 minutos post-irradiación UV o Mock.

### 25.3. Inmunoprecipitación

Los niveles de proteínas totales de los lisados sonicados para cada condición se cuantificaron mediante el método de ácido bicinonínico, detallado previamente. Para

realizar el ChIP, un volumen de lisado correspondiente a una masa de 500 µg de proteína se incubó con 4 µl de anticuerpo primario monoclonal (*mouse*) anti-HA (Covance MMS-101R) y 20 µl de *beads* de agarosa proteína A/G PLUS (Santa Cruz Biotechnology sc-2003) durante 16 horas a 4°C en rotación suave y constante. Las *beads* fueron luego sometidas a tres lavados de 5 minutos en rotación a temperatura ambiente con 500 µl de buffer RIPA de ChIP. La elución se llevó a cabo al incubar las *beads* en termobloque a 65°C durante 10 minutos con 150 µl de buffer de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8, SDS 1%, EDTA 10 mM pH 8), seguido de centrifugación a 2400 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente.

#### **25.4. Reversión del cross-linking y extracción del ADN**

La reversión del *cross-linking* y extracción del ADN se realizó según fue indicado previamente (ver 17.4. *Inmunoprecipitación de la cromatina - Reversión del cross-linking y extracción del ADN*). Masas equivalentes del ADN extraído (200 ng) fueron sembradas en una membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, GE Healthcare) mediante un aparato de Slot Blot (Life Technologies), y las lesiones al ADN inducidas por UV fueron visualizadas de la forma detallada previamente (ver 21. *Ensayo de reparación del ADN - Slot Blot*).

#### **26. Microirradiación y live-cell imaging**

*Live-cell imaging* comprende el estudio de células vivas mediante microscopía en un determinado lapso de tiempo. Se partió de  $2 \times 10^5$  células SH-SY5Y sembradas en placas de 35 mm con vidrios aptos para microscopía en sus bases, las cuales fueron transfectadas con los plásmidos E2F1-GFP o E2F2-GFP de la manera mencionada anteriormente. Transcurridas 18 horas post-transfección, se llevó a cabo la microirradiación y estudio por *live-cell imaging*. Para ello, se utilizó un microscopio confocal invertido Nikon A1, el cual está equipado con una cámara que mantiene las condiciones de temperatura, humedad y gas adecuadas para cultivo celular. Cuando fue indicado, se agregó al medio el fotosensibilizador Ro 19-8022 a una concentración 5 µM, 5 minutos previo a la microirradiación. Esta se realizó en regiones preseleccionadas de 1 µm<sup>2</sup> durante ~6 segundos con un láser a 405 nm al 10% de potencia. Se adquirieron series de imágenes confocales de una sección del eje Z cada 1 segundo con el microscopio a 488 nm al 5% de potencia, durante 6 segundos previos y 1 minuto posterior a la microirradiación. Se evaluó la cinética de reclutamiento de E2F1-GFP y E2F2-GFP al determinar las intensidades de fluorescencia de la zona

microirradiada durante el minuto de análisis, normalizadas al valor inmediato post-irradiación.

## **27. Análisis estadístico de datos**

El análisis estadístico de datos fue llevado a cabo con el *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, Estados Unidos). Las diferencias estadísticas fueron determinadas aplicando el test de análisis de la varianza (ANOVA) de un factor seguido por un test de Tukey para comparaciones múltiples, o bien seguido por un test de Dunnett para comparaciones contra un grupo control. El test estadístico  $\tau$ -student fue aplicado para la comparación de solamente dos grupos independientes. Valores  $P < 0,05$  fueron considerados significativamente diferentes.

# Referencias



- Asano, M., J. R. Nevins, et al. (1996). "Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in Drosophila imaginal discs." Genes Dev **10**(11): 1422-1432.
- Barzilai, A. (2007). "The contribution of the DNA damage response to neuronal viability." Antioxid Redox Signal **9**(2): 211-218.
- Barzilai, A. (2010). "DNA damage, neuronal and glial cell death and neurodegeneration." Apoptosis **15**(11): 1371-1381.
- Barzilai, A., S. Biton, et al. (2008). "The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance." DNA Repair (Amst) **7**(7): 1010-1027.
- Bates, S., A. C. Phillips, et al. (1998). "p14ARF links the tumour suppressors RB and p53." Nature **395**(6698): 124-125.
- Batista, L. F., B. Kaina, et al. (2009). "How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis." Mutat Res **681**(2-3): 197-208.
- Becker, E. B. and A. Bonni (2004). "Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease." Prog Neurobiol **72**(1): 1-25.
- Beckmann, A. M. and P. A. Wilce (1997). "Egr transcription factors in the nervous system." Neurochem Int **31**(4): 477-510; discussion 517-476.
- Belluscio, L. M., L. E. Giono, et al. (2011). "Abstracts of the 47th Annual Meeting of the Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology Research, October 30-September 2, 2011, San Luis, Argentina." Biocell **35 Suppl**: 27-132.
- Berton, T. R., D. L. Mitchell, et al. (2005). "Regulation of epidermal apoptosis and DNA repair by E2F1 in response to ultraviolet B radiation." Oncogene **24**(15): 2449-2460.
- Bindra, R. S., S. L. Gibson, et al. (2005). "Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs." Cancer Res **65**(24): 11597-11604.
- Biswas, A. K. and D. G. Johnson (2012). "Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage." Cancer Res **72**(1): 13-17.
- Blattner, C., A. Sparks, et al. (1999). "Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53." Mol Cell Biol **19**(5): 3704-3713.

- Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 725-731.
- Bonni, A., A. Brunet, et al. (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." Science **286**(5443): 1358-1362.
- Bracken, A. P., M. Ciro, et al. (2004). "E2F target genes: unraveling the biology." Trends Biochem Sci **29**(8): 409-417.
- Brand, M., J. G. Moggs, et al. (2001). "UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIIC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation." EMBO J **20**(12): 3187-3196.
- Branzei, D. and M. Foiani (2008). "Regulation of DNA repair throughout the cell cycle." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(4): 297-308.
- Bug, M. and M. Dobbelsstein (2011). "Anthracyclines induce the accumulation of mutant p53 through E2F1-dependent and -independent mechanisms." Oncogene **30**(33): 3612-3624.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Caceres, A., G. A. Banker, et al. (1986). "Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture." J Neurosci **6**(3): 714-722.
- Campanero, M. R. and E. K. Flemington (1997). "Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2221-2226.
- Carcagno, A. L., M. F. Ogara, et al. (2009). "E2F1 transcription is induced by genotoxic stress through ATM/ATR activation." IUBMB Life **61**(5): 537-543.

- Carmichael, J., W. G. DeGraff, et al. (1987). "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity." Cancer Res **47**(4): 943-946.
- Cartwright, P., H. Muller, et al. (1998). "E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription." Oncogene **17**(5): 611-623.
- Cobrinik, D. (2005). "Pocket proteins and cell cycle control." Oncogene **24**(17): 2796-2809.
- Coelho, M. and J. J. Ferreira (2012). "Late-stage Parkinson disease." Nat Rev Neurol **8**(8): 435-442.
- Chaussepied, M. and D. Ginsberg (2005). "E2F and signal transduction pathways." Cell Cycle **4**(3): 392-396.
- Chen, D., Z. Yu, et al. (2008). "E2F1 regulates the base excision repair gene XRCC1 and promotes DNA repair." J Biol Chem **283**(22): 15381-15389.
- Chen, H. Z., S. Y. Tsai, et al. (2009). "Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control." Nat Rev Cancer **9**(11): 785-797.
- Chen, J., F. Zhu, et al. (2011). "E2F1 promotes the recruitment of DNA repair factors to sites of DNA double-strand breaks." Cell Cycle **10**(8): 1287-1294.
- Chen, Y. C., S. C. Shen, et al. (2005). "Prostaglandin D(2) and J(2) induce apoptosis in human leukemia cells via activation of the caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species." Biochim Biophys Acta **1743**(3): 291-304.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Christensen, J., P. Cloos, et al. (2005). "Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription." Nucleic Acids Res **33**(17): 5458-5470.
- Dasgupta, D. and I. H. Goldberg (1985). "Mode of reversible binding of neocarzinostatin chromophore to DNA: evidence for binding via the minor groove." Biochemistry **24**(24): 6913-6920.

- David, S. S., V. L. O'Shea, et al. (2007). "Base-excision repair of oxidative DNA damage." Nature **447**(7147): 941-950.
- DeGregori, J. (2005). "E2F and cell survival: context really is key." Dev Cell **9**(4): 442-444.
- DeGregori, J. and D. G. Johnson (2006). "Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis." Curr Mol Med **6**(7): 739-748.
- Deng, C. X. (2006). "BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution." Nucleic Acids Res **34**(5): 1416-1426.
- Di Stefano, L., M. R. Jensen, et al. (2003). "E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes." EMBO J **22**(23): 6289-6298.
- Diderich, K., M. Alanazi, et al. (2011). "Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders." DNA Repair (Amst) **10**(7): 772-780.
- Dimova, D. K. and N. J. Dyson (2005). "The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces." Oncogene **24**(17): 2810-2826.
- Dogra, S. C., C. N. Hahn, et al. (1993). "Superinduction by cycloheximide of cytochrome P4502H1 and 5-aminolevulinate synthase gene transcription in chick embryo liver." Arch Biochem Biophys **300**(1): 531-534.
- Dynlacht, B. D., A. Brook, et al. (1994). "DNA-binding and trans-activation properties of Drosophila E2F and DP proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6359-6363.
- Eilam, R., Y. Peter, et al. (1998). "Selective loss of dopaminergic nigro-striatal neurons in brains of Atm-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12653-12656.
- Ennis, H. L. and M. Lubin (1964). "Cycloheximide: Aspects of Inhibition of Protein Synthesis in Mammalian Cells." Science **146**(3650): 1474-1476.
- Evans, T. A., A. K. Raina, et al. (2007). "BRCA1 may modulate neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer disease." Int J Med Sci **4**(3): 140-145.
- Fabrizio, E., S. El Messaoudi, et al. (2002). "Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5." EMBO Rep **3**(7): 641-645.



- Fenton, H. J. H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in presence of iron." Journal of the Chemical Society, Transactions **65**: 899-910.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Lee, et al. (2004). "H2AX: the histone guardian of the genome." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 959-967.
- Ferreira, R., L. Magnaghi-Jaulin, et al. (1998). "The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10493-10498.
- Field, S. J., F. Y. Tsai, et al. (1996). "E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation." Cell **85**(4): 549-561.
- Fishel, M. L., M. R. Vasko, et al. (2007). "DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair?" Mutat Res **614**(1-2): 24-36.
- Fousteri, M., W. Vermeulen, et al. (2006). "Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo." Mol Cell **23**(4): 471-482.
- Frolov, M. V. and N. J. Dyson (2004). "Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2173-2181.
- Galat, A. and I. H. Goldberg (1990). "Molecular models of neocarzinostatin damage of DNA: analysis of sequence dependence in 5'GAGCG:5'CGCTC." Nucleic Acids Res **18**(8): 2093-2099.
- Galbiati, L., R. Mendoza-Maldonado, et al. (2005). "Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination." Cell Cycle **4**(7): 930-939.
- Goldberg, I. H. (1987). "Free radical mechanisms in neocarzinostatin-induced DNA damage." Free Radic Biol Med **3**(1): 41-54.
- Gospodinov, A., I. Tsaneva, et al. (2009). "RAD51 foci formation in response to DNA damage is modulated by TIP49." Int J Biochem Cell Biol **41**(4): 925-933.
- Gu, B. and W. G. Zhu (2012). "Surf the post-translational modification network of p53 regulation." Int J Biol Sci **8**(5): 672-684.

- Guo, R., J. Chen, et al. (2011). "GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage." Nucleic Acids Res **39**(4): 1390-1397.
- Guo, R., J. Chen, et al. (2010). "E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair." J Biol Chem **285**(25): 19308-19315.
- Halaby, M. J. and D. Q. Yang (2007). "p53 translational control: a new facet of p53 regulation and its implication for tumorigenesis and cancer therapeutics." Gene **395**(1-2): 1-7.
- Hallahan, D. E., E. Dunphy, et al. (1995). "C-jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure." J Biol Chem **270**(51): 30303-30309.
- Halliwell, B. (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" J Neurochem **97**(6): 1634-1658.
- Hallstrom, T. C. and J. R. Nevins (2006). "Jab1 is a specificity factor for E2F1-induced apoptosis." Genes Dev **20**(5): 613-623.
- Harper, J. W. and S. J. Elledge (2007). "The DNA damage response: ten years after." Mol Cell **28**(5): 739-745.
- Harris, K. F., J. B. Christensen, et al. (1998). "Novel mechanisms of E2F induction by BK virus large-T antigen: requirement of both the pRb-binding and the J domains." Mol Cell Biol **18**(3): 1746-1756.
- Hauck, L., R. G. Kaba, et al. (2002). "Regulation of E2F1-dependent gene transcription and apoptosis by the ETS-related transcription factor GABPgamma1." Mol Cell Biol **22**(7): 2147-2158.
- He, Y., M. K. Armanious, et al. (2000). "Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region." Oncogene **19**(30): 3422-3433.
- Henle, E. S. and S. Linn (1997). "Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide." J Biol Chem **272**(31): 19095-19098.
- Hiebert, S. W., S. P. Chellappan, et al. (1992). "The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F." Genes Dev **6**(2): 177-185.

- Hirama, T. and H. P. Koeffler (1995). "Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer." Blood **86**(3): 841-854.
- Huang, R. P., Y. Fan, et al. (1998). "Egr-1 inhibits apoptosis during the UV response: correlation of cell survival with Egr-1 phosphorylation." Cell Death Differ **5**(1): 96-106.
- Huang, Y., T. Ishiko, et al. (1997). "Role for E2F in DNA damage-induced entry of cells into S phase." Cancer Res **57**(17): 3640-3643.
- Ianari, A., R. Gallo, et al. (2004). "Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage." J Biol Chem **279**(29): 30830-30835.
- Iaquinta, P. J. and J. A. Lees (2007). "Life and death decisions by the E2F transcription factors." Curr Opin Cell Biol **19**(6): 649-657.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-28.
- Ishida, N., K. Miyazaki, et al. (1965). "Neocarzinostatin, an Antitumor Antibiotic of High Molecular Weight. Isolation, Physiochemical Properties and Biological Activities." J Antibiot (Tokyo) **18**: 68-76.
- Iwanaga, R., H. Komori, et al. (2004). "Differential regulation of expression of the mammalian DNA repair genes by growth stimulation." Oncogene **23**(53): 8581-8590.
- Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-1078.
- Jacobsen, E., T. Beach, et al. (2004). "Deficiency of the Mre11 DNA repair complex in Alzheimer's disease brains." Brain Res Mol Brain Res **128**(1): 1-7.
- Jeon, G. S., K. Y. Kim, et al. (2012). "Deregulation of BRCA1 leads to impaired spatiotemporal dynamics of gamma-H2AX and DNA damage responses in Huntington's disease." Mol Neurobiol **45**(3): 550-563.
- Jiricny, J. (2006). "The multifaceted mismatch-repair system." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 335-346.

- Kamileri, I., I. Karakasilioti, et al. (2012). "Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks." Trends Genet **28**(11): 566-573.
- Katyal, S. and P. J. McKinnon (2007). "DNA repair deficiency and neurodegeneration." Cell Cycle **6**(19): 2360-2365.
- Kontaki, H. and I. Talianidis (2010). "Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death." Mol Cell **39**(1): 152-160.
- Kovesdi, I., R. Reichel, et al. (1986). "Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation." Cell **45**(2): 219-228.
- Kowalik, T. F., J. DeGregori, et al. (1998). "E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2." Cell Growth Differ **9**(2): 113-118.
- Krejci, L., V. Altmannova, et al. (2012). "Homologous recombination and its regulation." Nucleic Acids Res **40**(13): 5795-5818.
- Krek, W., M. E. Ewen, et al. (1994). "Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase." Cell **78**(1): 161-172.
- Krstic, D. and I. Knuesel (2013). "Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease." Nat Rev Neurol **9**(1): 25-34.
- Kruman, II (2004). "Why do neurons enter the cell cycle?" Cell Cycle **3**(6): 769-773.
- Kruse, J. P. and W. Gu (2009). "Modes of p53 regulation." Cell **137**(4): 609-622.
- Kuljis, R. O., Y. Xu, et al. (1997). "Degeneration of neurons, synapses, and neuropil and glial activation in a murine Atm knockout model of ataxia-telangiectasia." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12688-12693.
- Kulkarni, A. and D. M. Wilson, 3rd (2008). "The involvement of DNA-damage and -repair defects in neurological dysfunction." Am J Hum Genet **82**(3): 539-566.
- Kumagai, A., J. Lee, et al. (2006). "TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex." Cell **124**(5): 943-955.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lammens, T., J. Li, et al. (2009). "Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family." Trends Cell Biol **19**(3): 111-118.
- Lanni, C., M. Racchi, et al. (2012). "p53 at the crossroads between cancer and neurodegeneration." Free Radic Biol Med **52**(9): 1727-1733.
- Lazzaro, F., M. Giannattasio, et al. (2009). "Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair." DNA Repair (Amst) **8**(9): 1055-1067.
- Lee, J. H. and T. T. Paull (2005). "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex." Science **308**(5721): 551-554.
- Lee, Y. and P. J. McKinnon (2007). "Responding to DNA double strand breaks in the nervous system." Neuroscience **145**(4): 1365-1374.
- Leone, G., F. Nuckolls, et al. (2000). "Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins." Mol Cell Biol **20**(10): 3626-3632.
- Lin, W. C., F. T. Lin, et al. (2001). "Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation." Genes Dev **15**(14): 1833-1844.
- Lindahl, T. and D. E. Barnes (2000). "Repair of endogenous DNA damage." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **65**: 127-133.
- Liu, K., F. T. Lin, et al. (2003). "Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1." Mol Cell Biol **23**(9): 3287-3304.
- Liu, K., Y. Luo, et al. (2004). "TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival." Genes Dev **18**(6): 673-686.
- Liu, K., J. C. Paik, et al. (2006). "Regulation of TopBP1 oligomerization by Akt/PKB for cell survival." EMBO J **25**(20): 4795-4807.
- Liu, N., G. Stoica, et al. (2005). "ATM deficiency induces oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in astrocytes." Lab Invest **85**(12): 1471-1480.

- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lord, C. J. and A. Ashworth (2012). "The DNA damage response and cancer therapy." Nature **481**(7381): 287-294.
- Luo, R. X., A. A. Postigo, et al. (1998). "Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription." Cell **92**(4): 463-473.
- Ma, Y., S. N. Freeman, et al. (2004). "E2F4 deficiency promotes drug-induced apoptosis." Cancer Biol Ther **3**(12): 1262-1269.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, et al. (2007). "RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins." Cell **131**(5): 887-900.
- Martinez-Balbas, M. A., U. M. Bauer, et al. (2000). "Regulation of E2F1 activity by acetylation." EMBO J **19**(4): 662-671.
- Martinez, L. A., E. Goluszko, et al. (2010). "E2F3 is a mediator of DNA damage-induced apoptosis." Mol Cell Biol **30**(2): 524-536.
- Maser, R. S., O. K. Mirzoeva, et al. (2001). "Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis." Mol Cell Biol **21**(17): 6006-6016.
- Massip, A., T. Arondeguy, et al. (2013). "E2F1 activates p53 transcription through its distal site and participates in apoptosis induction in HPV-positive cells." FEBS Lett **587**(19): 3188-3194.
- McKinnon, P. J. (2009). "DNA repair deficiency and neurological disease." Nat Rev Neurosci **10**(2): 100-112.
- McMaster, G. K. and G. G. Carmichael (1977). "Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(11): 4835-4838.
- McMurray, C. T. (2005). "To die or not to die: DNA repair in neurons." Mutat Res **577**(1-2): 260-274.

- Medeiros, R. and F. M. LaFerla (2013). "Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony." Exp Neurol **239**: 133-138.
- Mendez, J. and B. Stillman (2000). "Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis." Mol Cell Biol **20**(22): 8602-8612.
- Mladenov, E., B. Anachkova, et al. (2006). "Sub-nuclear localization of Rad51 in response to DNA damage." Genes Cells **11**(5): 513-524.
- Morris, L., K. E. Allen, et al. (2000). "Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators." Nat Cell Biol **2**(4): 232-239.
- Muller, H., A. P. Bracken, et al. (2001). "E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis." Genes Dev **15**(3): 267-285.
- Nam, J. H., K. W. Park, et al. (2012). "Interleukin-13/-4-induced oxidative stress contributes to death of hippocampal neurons in abeta1-42-treated hippocampus in vivo." Antioxid Redox Signal **16**(12): 1369-1383.
- Nevins, J. R., G. Leone, et al. (1997). "Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control." J Cell Physiol **173**(2): 233-236.
- Norbury, C. and P. Nurse (1992). "Animal cell cycles and their control." Annu Rev Biochem **61**: 441-470.
- Nospikel, T. (2007). "DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions." Neuroscience **145**(4): 1213-1221.
- Nospikel, T. and P. C. Hanawalt (2000). "Terminally differentiated human neurons repair transcribed genes but display attenuated global DNA repair and modulation of repair gene expression." Mol Cell Biol **20**(5): 1562-1570.
- Nospikel, T. and P. C. Hanawalt (2002). "DNA repair in terminally differentiated cells." DNA Repair (Amst) **1**(1): 59-75.
- O'Connor, D. J. and X. Lu (2000). "Stress signals induce transcriptionally inactive E2F-1 independently of p53 and Rb." Oncogene **19**(20): 2369-2376.

- Ortega, S., M. Malumbres, et al. (2002). "Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer." Biochim Biophys Acta **1602**(1): 73-87.
- Page, B. D., S. Guedes, et al. (2001). "The C. elegans E2F- and DP-related proteins are required for embryonic asymmetry and negatively regulate Ras/MAPK signaling." Mol Cell **7**(3): 451-460.
- Pardee, A. B. (1974). "A restriction point for control of normal animal cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(4): 1286-1290.
- Pardee, A. B. (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation." Science **246**(4930): 603-608.
- Parsons, J. L. and G. L. Dianov (2013). "Co-ordination of base excision repair and genome stability." DNA Repair (Amst) **12**(5): 326-333.
- Pediconi, N., F. Guerrieri, et al. (2009). "hSirT1-dependent regulation of the PCAF-E2F1-p73 apoptotic pathway in response to DNA damage." Mol Cell Biol **29**(8): 1989-1998.
- Pediconi, N., A. Ianari, et al. (2003). "Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage." Nat Cell Biol **5**(6): 552-558.
- Pines, J. (1991). "Cyclins: wheels within wheels." Cell Growth Differ **2**(6): 305-310.
- Pines, J. (1995). "Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations." Adv Cancer Res **66**: 181-212.
- Polager, S. and D. Ginsberg (2008). "E2F - at the crossroads of life and death." Trends Cell Biol **18**(11): 528-535.
- Polager, S., Y. Kalma, et al. (2002). "E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis." Oncogene **21**(3): 437-446.
- Porter, A. G. and R. U. Janicke (1999). "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis." Cell Death Differ **6**(2): 99-104.
- Prost, S., P. Lu, et al. (2007). "E2F regulates DDB2: consequences for DNA repair in Rb-deficient cells." Oncogene **26**(24): 3572-3581.



- Quinones, A., K. U. Dobberstein, et al. (2003). "The egr-1 gene is induced by DNA-damaging agents and non-genotoxic drugs in both normal and neoplastic human cells." Life Sci **72**(26): 2975-2992.
- Raghupathi, R., D. I. Graham, et al. (2000). "Apoptosis after traumatic brain injury." J Neurotrauma **17**(10): 927-938.
- Raina, A. K., A. Hochman, et al. (2001). "Abortive apoptosis in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **101**(4): 305-310.
- Ramirez-Parra, E., Q. Xie, et al. (1999). "The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators." Nucleic Acids Res **27**(17): 3527-3533.
- Rass, U., I. Ahel, et al. (2007). "Defective DNA repair and neurodegenerative disease." Cell **130**(6): 991-1004.
- Real, S., L. Espada, et al. (2010). "Study of the in vivo phosphorylation of E2F1 on Ser403." Biochim Biophys Acta **1803**(8): 912-918.
- Reichel, R., I. Kovesdi, et al. (1987). "Developmental control of a promoter-specific factor that is also regulated by the E1A gene product." Cell **48**(3): 501-506.
- Ren, B., H. Cam, et al. (2002). "E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints." Genes Dev **16**(2): 245-256.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, et al. (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." J Biol Chem **273**(10): 5858-5868.
- Roos, W. P. and B. Kaina (2013). "DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis." Cancer Lett **332**(2): 237-248.
- Sambrook, J. M., Tom; Fritsch, E. F; Cold Spring Harbor Laboratory (1987). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Filippo, J., P. Sung, et al. (2008). "Mechanism of eukaryotic homologous recombination." Annu Rev Biochem **77**: 229-257.

- Scassa, M. E., M. C. Marazita, et al. (2007). "Cell cycle inhibitor, p19INK4d, promotes cell survival and decreases chromosomal aberrations after genotoxic insult due to enhanced DNA repair." DNA Repair (Amst) **6**(5): 626-638.
- Schafer, K. A. (1998). "The cell cycle: a review." Vet Pathol **35**(6): 461-478.
- Seed, B. and J. Y. Sheen (1988). "A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity." Gene **67**(2): 271-277.
- Shackelford, R. E., R. P. Manuszak, et al. (2003). "Desferrioxamine treatment increases the genomic stability of Ataxia-telangiectasia cells." DNA Repair (Amst) **2**(9): 971-981.
- Sharma, A., K. Singh, et al. (2012). "Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage." Methods Mol Biol **920**: 613-626.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-1512.
- Shin, S. Y., C. G. Kim, et al. (2013). "Egr-1 regulates the transcription of the BRCA1 gene by etoposide." BMB Rep **46**(2): 92-96.
- Smith, B. L., G. B. Bauer, et al. (1994). "DNA damage induced by bleomycin, neocarzinostatin, and melphalan in a precisely positioned nucleosome. Asymmetry in protection at the periphery of nucleosome-bound DNA." J Biol Chem **269**(48): 30587-30594.
- Sobell, H. M. (1985). "Actinomycin and DNA transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(16): 5328-5331.
- Stevaux, O. and N. J. Dyson (2002). "A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function." Curr Opin Cell Biol **14**(6): 684-691.
- Stevens, C., L. Smith, et al. (2003). "Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage." Nat Cell Biol **5**(5): 401-409.
- Strober, B. E., J. L. Dunaief, et al. (1996). "Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins." Mol Cell Biol **16**(4): 1576-1583.

- Stucki, M. and S. P. Jackson (2006). "gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes." DNA Repair (Amst) **5**(5): 534-543.
- Su, T. T. (2006). "Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices." Annu Rev Genet **40**: 187-208.
- Suzuki, A. and A. Hemmati-Brivanlou (2000). "Xenopus embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis." Mol Cell **5**(2): 217-229.
- Taubert, S., C. Gorrini, et al. (2004). "E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1." Mol Cell Biol **24**(10): 4546-4556.
- Tedeschi, A. and S. Di Giovanni (2009). "The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon." EMBO Rep **10**(6): 576-583.
- Trimarchi, J. M., B. Fairchild, et al. (2001). "The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1519-1524.
- Trimarchi, J. M. and J. A. Lees (2002). "Sibling rivalry in the E2F family." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(1): 11-20.
- van den Heuvel, S. and E. Harlow (1993). "Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control." Science **262**(5142): 2050-2054.
- van der Leun, J. C. (2004). "The ozone layer." Photodermatol Photoimmunol Photomed **20**(4): 159-162.
- Vandel, L., E. Nicolas, et al. (2001). "Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase." Mol Cell Biol **21**(19): 6484-6494.
- Vigo, E., H. Muller, et al. (1999). "CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase." Mol Cell Biol **19**(9): 6379-6395.

- Vyjayanti, V. N. and K. S. Rao (2006). "DNA double strand break repair in brain: reduced NHEJ activity in aging rat neurons." Neurosci Lett **393**(1): 18-22.
- Wang, B., K. Liu, et al. (2004). "A role for 14-3-3 tau in E2F1 stabilization and DNA damage-induced apoptosis." J Biol Chem **279**(52): 54140-54152.
- Wang, C., L. Chen, et al. (2006). "Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage." Nat Cell Biol **8**(9): 1025-1031.
- Weiner, H. L. and D. Frenkel (2006). "Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease." Nat Rev Immunol **6**(5): 404-416.
- Weissman, L., N. C. de Souza-Pinto, et al. (2007). "DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration." Neuroscience **145**(4): 1318-1329.
- Weterings, E. and D. J. Chen (2008). "The endless tale of non-homologous end-joining." Cell Res **18**(1): 114-124.
- Wikonkal, N. M., E. Remenyik, et al. (2003). "Inactivating E2f1 reverts apoptosis resistance and cancer sensitivity in Trp53-deficient mice." Nat Cell Biol **5**(7): 655-660.
- Will, O., E. Gocke, et al. (1999). "Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022." Mutat Res **435**(1): 89-101.
- Wu, J., L. Y. Lu, et al. (2010). "The role of BRCA1 in DNA damage response." Protein Cell **1**(2): 117-123.
- Yamasaki, L., T. Jacks, et al. (1996). "Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1." Cell **85**(4): 537-548.
- Yang, S. Z., F. T. Lin, et al. (2008). "MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis." EMBO Rep **9**(9): 907-915.
- Yang, X. H. and L. Zou (2006). "Checkpoint and coordinated cellular responses to DNA damage." Results Probl Cell Differ **42**: 65-92.
- Yang, Y. and K. Herrup (2007). "Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons?" Biochim Biophys Acta **1772**(4): 457-466.

- 
- Youn, C. K., H. J. Cho, et al. (2005). "Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity." Nat Cell Biol **7**(2): 137-147.
- Yuan, J. and B. A. Yankner (2000). "Apoptosis in the nervous system." Nature **407**(6805): 802-809.
- Zalmas, L. P., X. Zhao, et al. (2008). "DNA-damage response control of E2F7 and E2F8." EMBO Rep **9**(3): 252-259.
- Zhou, B. B. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**(6811): 433-439.
- Zhu, J. W., S. J. Field, et al. (2001). "E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis." Mol Cell Biol **21**(24): 8547-8564.
- Ziebold, U., T. Reza, et al. (2001). "E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos." Genes Dev **15**(4): 386-391.
- Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science **300**(5625): 1542-1548.

# Apéndice



Este trabajo de tesis dio lugar a la siguiente publicación:

Cell Cycle, 2015; 14(8):1300-14

*E2F1 and E2F2 induction in response to DNA damage preserves genomic stability in neuronal cells*

Daniela S. Castillo, Anna Campalans, Laura M. Belluscio, Abel L. Carcagno, J. Pablo Radicella, Eduardo T. Cánepa, Nicolás Pregi